FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1930 N°

THÈSE 1913

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jeanne LÉVY

Docteur ès sciences physiques,
Chef du laboratoire de pharmacologie à la Faculté de Médecine de Paris.

Née le 5 novembre 1895, à Alger.

ESSAIS, DOSAGES ET CONTRÔLE BIOLOGIQUES DES SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES

Président : **M. TIFFENEAU,** Professeur

MASSON & C^IE, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e

1930

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1930 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

Jeanne LÉVY

Docteur ès sciences physiques,
Chef du laboratoire de pharmacologie à la Faculté de Médecine de Paris.

Née le 5 novembre 1895, à Alger.

ESSAIS, DOSAGES ET CONTRÔLE BIOLOGIQUES

DES SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES

Président : **M. TIFFENEAU,** Professeur

MASSON & C^IE, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e

1930

Doyen. . . . . . M. ROGER.

I. — Professeurs.

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale	CUNÉO.
Physiologie	ROGER.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et Thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	N.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LŒPER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MAURICE VILLARET.
Clinique médicale	CARNOT. BEZANÇON. ACHARD. MARCEL LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TEISSIER.
Clinique chirurgicale	DELBET. HARTMANN. LEJARS. GOSSET.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	LEGUEU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE. BRINDEAU. JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBREDANNE
Clinique thérapeutique médicale	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique	SÉBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale	PIERRE DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	LÉON BERNARD
Professeur sans chaire	MAUCLAIRE.

II. — Agrégés en exercice.

MM.	MM.	MM.	MM.
ALAJOUANINE.	LONZELOT.	LEMAITRE.	OLIVIER.
BINET.	ÉCALLE.	LEROUX.	PIÉDELIÈVRE.
AUBERTIN.	FEY.	LEVEUF.	PORTES.
BÉNARD HENRI.	GARNIER.	LÉVY-VALENSI.	QUENU.
BLANCHETIÈRE.	GASTINEL.	LIAN.	RICHET.
BROCQ.	GATELLIER.	MERCIER FERNAND.	SÉZARY.
BRULÉ.	GIROUD.	MILLOT.	VALLERY-RADOT (Pasteur).
CADENAT.	HARVIER.	MONDOR.	VAUDESCAL.
CATHALA.	HOVELACQUE.	MOREAU.	VELTER.
CHABROL.	HUTINEL.	MOULONGUET.	VERNE.
CHEVALLIER.	JOANNON.	MOURE.	VIGNES.
DE GAUDART D'ALLAINES	JOYEUX.	MULON.	
DOGNON.	LABBÉ HENRI.	OBERLING.	
	LAROCHE GUY.		

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES PARENTS

A MON FRÈRE

MEIS ET AMICIS

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

A MES MAÎTRES DU COLLÈGE DE FRANCE

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

A MES MAÎTRES DES HÔPITAUX

A M. le Professeur M. TIFFENEAU
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

qui, après avoir été mon maître en chimie, me fit connaître et aimer les sciences pharmacologiques.
Témoignage de ma profonde et affectueuse reconnaissance.

ESSAIS, DOSAGES, CONTRÔLE BIOLOGIQUES DES SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES

INTRODUCTION

Depuis 1638, conformément aux ordonnances royales, les préparations des différentes drogues utilisées en thérapeutique furent enregistrées dans des formulaires rédigés par des commissions spéciales. Mais ce n'est qu'en 1748, qu'un arrêt du Parlement rendit obligatoire l'emploi de substances médicamenteuses uniformes en prescrivant aux apothicaires de Paris, pour ce qui concerne la préparation et la vente de ces substances, de se conformer au nouveau formulaire officiel, le *Codex medicamentarius Parisiensis,* qui n'était lui-même que la sixième édition des anciens recueils de formules.

Par la loi du 21 Germinal an XI (11 avril 1803) cette disposition fut étendue à toute la France. Mais le Codex qui fut rédigé conformément à cette loi et à l'ordonnance ultérieure de 1816 ne parut qu'en 1818. Depuis se succédèrent quatre nouvelles éditions du Codex en 1837, 1867, 1884, 1908, avec leurs suppléments respectifs parus dans les intervalles de ces dates.

A la dernière édition de 1908 sont venus s'adjoindre deux suppléments parus l'un en 1920, l'autre en 1925. Depuis 1920 d'ailleurs, pour remédier aux inconvénients résultant de la publication trop espacée des suppléments, tout nouveau médicament dont l'inscription au formulaire officiel est décidée par

la commission du Codex, fait l'objet d'un décret publié au *Journal Officiel* dans lequel se trouvent indiqués, comme dans le Codex lui-même, les caractères du médicament et les conditions de son contrôle.

Jusqu'ici, aussi bien dans le Codex de 1908 que dans ses suppléments et additions par décret, le contrôle des médicaments a surtout été d'ordre chimique. C'est seulement depuis 1928 que la Commission du Codex adopta pour les arsénobenzols une méthode de contrôle biologique[1], consacrant ainsi un principe déjà appliqué par de nombreux laboratoires industriels. qui consiste à substituer le dosage biologique effectué sur l'animal, au dosage chimique, lorsque celui-ci est reconnu insuffisant ou impossible. On constate en effet, que lorsque la composition chimique d'une drogue n'est pas connue ou même, lorsque celle-ci étant suffisamment précisée, l'action thérapeutique de la drogue entière est due à plusieurs constituants définis. inégalement actifs et difficilement séparables, il faut de toute nécessité recourir au dosage biologique dans le cas où celui-ci est possible. Les avantages que présente sur l'analyse chimique une telle méthode sont si considérables que malgré les difficultés rencontrées dans sa pratique. difficultés sur lesquelles nous insisterons plus loin, ces méthodes ont. dans bien des cas, peu à peu, soit complété, soit remplacé les méthodes chimiques. Aussi les pharmacopées des diverses nations (Etats-Unis[2]. Allemagne, Grande-Bretagne, Suède) les ont-elles considérées comme suffisamment précises pour les adopter. Nous venons de voir que la France est entrée dans cette voie avec les arsénobenzols et tout donne lieu de penser que ces méthodes seront généralisées dans la prochaine édition du Codex.

1. La nécessité des essais biologiques est nettement apparue lorsqu'il fallut préparer des sérums thérapeutiques. L'étalonnage des sérums commerciaux s'effectue par des méthodes biologiques qui sont officiellement inscrites au Codex (1908).

2. La pharmacopée des États-Unis U. S. P. IX a adopté dès 1910 la standardisation biologique de l'extrait pituitaire et du chanvre indien.

La mise au point des méthodes de dosage biologique est longue et délicate ; c'est pourquoi, dans le but d'établir les meilleures techniques et de les uniformiser, des commissions internationales se sont déjà réunies, sous les auspices de la Société des Nations, à trois reprises, en juillet 1923 à Edimbourg, en août 1925 à Genève, en avril 1928 à Francfort-sur-le-Mein. Après avoir examiné et discuté les différentes méthodes de dosage biologique, ces commissions envisagèrent les possibilités suivantes : unification dans les différents pays des principes et des techniques de dosage, adoption d'étalons de comparaison, et enfin définition pour chaque médicament d'une unité internationale basée sur l'activité biologique. Les décisions prises par ces commissions n'ont eu jusqu'ici aucun caractère obligatoire ; elles ont consisté en recommandations. Mais, étant donné que les conclusions adoptées par les commissions internationales reposent sur les travaux expérimentaux et les avis des principaux pharmacologistes spécialisés dans les questions de dosage biologique, elles constituent une base solide dont il n'est permis de s'écarter qu'à condition de découvrir des méthodes plus précises ou d'une spécificité plus parfaite. D'ailleurs la Conférence internationale pour l'unification des médicaments héroïques et la standardisation des médicaments biologiques a décidé dans sa deuxième réunion tenue à Bruxelles en 1925 d'adopter les conclusions de la Société des Nations concernant les dosages biologiques.

*
* *

Nous nous sommes proposé de consacrer cette étude à l'examen des différentes méthodes de dosages et d'essais biologiques[1]. Cette étude comprend trois parties. Dans la première partie sont exposés les principes généraux des méthodes biologiques

1. Nous indiquons dans la première partie de ce travail la différence qu'il convient de faire actuellement entre un essai et un dosage biologique.

de dosages ainsi que les discussions concernant leur précision et leurs causes d'erreurs.

La deuxième partie est consacrée à la description des principaux dosages biologiques[1] qui ont fait l'objet d'une étude systématique par les commissions internationales, à savoir : drogues digitaliques (digitale, strophantine, scille) ; adrénaline et extraits surrénaux ; préparations d'hypophyse ; ergot ; arsénobenzènes ; insuline ; préparations de thyroïde ; drogues anthelmintiques. Pour chacune de ces substances, on a exposé les principes et les méthodes recommandées par les commissions internationales en insistant particulièrement sur les techniques pour lesquelles il a été possible d'apporter une contribution personnelle.

Une troisième partie comprend la description de quelques essais et dosages biologiques particuliers concernant des substances non encore envisagées par les commissions internationales : antithermiques ; myotiques et mydriatiques ; vasoconstricteurs et vasodilatateurs ; anesthésiques locaux ; dérivés à base de poudre d'opium. Les méthodes exposées seront choisies parmi celles qui nous paraissent les plus précises, qu'elles aient été établies par d'autres pharmacologistes ou qu'elles résultent d'expériences personnelles.

1. Nous avons laissé volontairement de côté les dosages biologiques des vitamines.

PREMIERE PARTIE

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MÉTHODES D'ESSAIS DE DOSAGES ET DE CONTRÔLE BIOLOGIQUES ET SUR LES ERREURS INHÉRENTES A CES MÉTHODES

PRINCIPES DES MÉTHODES D'ESSAIS ET DE DOSAGES BIOLOGIQUES

L'insuffisance que présentent parfois les dosages chimiques notamment pour les drogues complexes, de composition inconnue ou variable obligea les pharmacologistes à envisager la possibilité de déterminer l'activité thérapeutique à l'aide de méthodes biologiques qui offrent l'avantage de ne pas nécessiter l'isolement de chacun des constituants actifs des médicaments puisqu'elles ont pour objet l'appréciation de leur action physiologique totale.

Le dosage biologique d'une substance médicamenteuse consiste essentiellement dans la mesure de l'action physiologique plus ou moins spécifique qu'exerce cette substance sur un animal ou sur un organe isolé. Cette mesure qui peut être effectuée aux différentes phases de l'action de la substance envisagée comporte la détermination de la quantité de substance nécessaire pour produire soit un effet spécifique passager, soit certains troubles fonctionnels caractéristiques, soit simplement la mort de l'animal. Chacun de ces effets comporte d'ailleurs des causes d'erreur sensiblement identiques, erreurs qui sont inhérentes à tous les dosages biologiques et dues, pour la plupart, aux variations individuelles de sensibilité du matériel vivant.

Les nombreuses recherches auxquelles a donné lieu l'étude minutieuse de telles méthodes ont permis de formuler quelques règles générales concernant les dosages biologiques.

Ces règles peuvent être résumées comme suit :

1° L'activité physiologique d'une substance médicamenteuse

n'est pas exprimable en valeur absolue mais seulement comparativement à une substance type choisie comme étalon de comparaison [1].

2° Les essais comparatifs de la substance médicamenteuse à examiner et de l'étalon doivent être effectués rigoureusement suivant la même technique. Dans ces conditions, les erreurs résultant des différences de sensibilité des divers animaux et de leurs variations saisonnières sont susceptibles de s'éliminer partiellement.

3° L'étalon peut être constitué soit par la substance médicamenteuse elle-même dont on a préparé spécialement un échantillon constant et stable, soit parfois, lorsqu'il s'agit d'une drogue végétale ou animale, par son principal constituant, à condition que celui-ci soit bien défini et stable.

Cette règle sur laquelle le Pr Dale [1], avec juste raison, a insisté vivement, n'a pas toujours été rigoureusement respectée. C'est ainsi que l'histamine et les sels de potassium ont longtemps servi d'étalon pour le dosage de l'ergot et de l'hypophyse et que la strophantine est, aujourd'hui encore, adoptée comme étalon pour le dosage de la digitale aux Etats-Unis.

4° L'activité qu'il convient de mesurer dans une substance médicamenteuse est celle du principe actif dont les propriétés spécifiques sont utilisées en thérapeutique. A cette condition les tests utilisés dans les dosages biologiques peuvent n'avoir que des rapports éloignés avec l'action thérapeutique de la drogue.

Ces règles, qui se dégagent de l'ensemble des recommandations faites par les commissions internationales réunies par le comité d'hygiène de la Société des Nations et qui concernent

1. Les essais qui expriment la valeur d'une préparation au moyen d'un chiffre représentant la concentration liminaire efficace ou la dose minimum mortelle ne peuvent fournir, pris individuellement, aucun renseignement précis sur l'activité d'une substance.

les dosages biologiques de certaines substances médicamenteuses, sont le plus souvent respectées. Elles le sont, notamment dans la plupart des dosages envisagés dans la deuxième partie de ce travail, c'est-à-dire dans les dosages des médicaments digitaliques, des extraits surrénaux, des préparations de lobe postérieur d'hypophyse, des arsénobenzènes, d'insuline, des préparations de thyroïde.

Cependant nous devons signaler que, dans un certain nombre de cas où l'on désire, non pas doser l'activité d'une substance par rapport à une autre substance de même nature, mais seulement classer des substances à action pharmacodynamique semblable par ordre d'activité croissante, il suffit de se conformer aux règles énoncées ci-dessus dans les paragraphes 1 et 2 pour pratiquer correctement, non plus un dosage, mais ce que nous désignerons sous le nom d'essai biologique. Dans la troisième partie de ce travail nous indiquons les techniques pharmacodynamiques qui permettent de comparer entre eux les antithermiques, les myotiques et les mydriatiques, les anesthésiques locaux, les vasoconstricteurs et les vasodilatateurs.

Les différentes méthodes utilisées dans les essais et les dosages biologiques peuvent être partagées en trois groupes suivant les principes sur lesquels elles sont fondées. Les unes sont basées sur une simple détermination de la toxicité pour un animal donné, suivant une technique nettement définie ; ce furent longtemps les seules employées ; d'autres utilisent une action élective et facilement contrôlable sur une fonction ou un appareil d'un animal choisi comme particulièrement sensible à cet effet ; enfin quelques méthodes étudient une action spécifique sur un organe isolé placé dans des conditions spéciales.

Nous jugeons utile d'insister ci-dessous sur les différents points qui viennent d'être exposés en ce qui concerne les étalons de comparaison et les différentes techniques de dosages biologiques.

ÉTALONS ET UNITÉS INTERNATIONALES

Nous venons de voir qu'une substance médicamenteuse dont on veut effectuer le dosage biologique doit être comparée au point de vue de son activité avec une substance étalon de même nature.

Bien qu'il semble possible à chacun, à condition de se conformer aux règles ci-dessus énoncées, d'établir une substance type en fonction de laquelle il pourra exprimer l'activité des substances médicamenteuses de même nature, une telle pratique qui n'aurait aucun caractère général ne saurait être préconisée. Dans le but d'éviter les confusions qui résulteraient de cet état de choses, les commissions internationales ont décidé de faire préparer spécialement, suivant certaines conventions, des étalons des différentes substances, étalons qui seront conservés dans un Institut central agissant au nom de l'Organisation d'hygiène de la Société des Nations et qui seront mis à la disposition des différents pays. Il est loisible à chaque État de préparer un étalon national et de le titrer par rapport à l'étalon international au moyen de méthodes qui sont familières à ses laboratoires officiels.

C'est seulement lorsque l'étalon international n'a pas encore été préparé qu'il est possible d'utiliser comme étalon de comparaison une substance chimiquement pure. C'est ainsi par exemple qu'une adrénaline dont on a vérifié la pureté chimique et l'activité optique peut servir d'étalon dans les dosages d'extraits surrénaux.

En résumé, on peut utiliser comme étalon soit l'étalon international, soit tout autre produit officinal de même nature, titré par rapport à ce dernier, soit enfin et seulement quand il n'existe pas d'étalon international, le principal constituant actif de la drogue animale ou végétale quand il a pu être extrait chimiquement pur.

Quel que soit l'étalon de comparaison adopté, il est toujours possible d'exprimer l'activité d'une substance médicamenteuse par rapport à l'activité d'un certain poids de l'étalon. Néanmoins les commissions internationales ont préconisé l'utilisation d'unités internationales pour exprimer la valeur d'un certain nombre de substances : digitale, hypophyse, insuline, arsénobenzène, thyroïde. Ces unités, arbitrairement définies comme toutes les unités de mesure, expriment l'activité d'un certain poids de poudre étalon. Dans chacun des chapitres qui traitent du dosage des substances médicamenteuses pour lesquelles il existe une unité internationale, nous donnerons la définition de cette unité.

DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE DOSAGES ET D'ESSAIS BIOLOGIQUES

I. *Détermination de la toxicité d'une substance.*

La détermination de la toxicité qui fut longtemps la seule méthode utilisée en pharmacologie pour rendre compte de la valeur d'un médicament peut être effectuée au moyen de techniques diverses. Le plus souvent, on détermine simplement la dose minimum mortelle par kilogramme d'animal mais, depuis quelques années, on utilise aussi une nouvelle méthode basée sur la sensibilité individuelle des animaux ; le pourcentage des mortalités qui se produisent dans les lots d'animaux injectés avec des doses inférieures aux doses minima mortelles étant proportionnel à la dose injectée.

1) **Détermination de la dose minimum mortelle.** — Cette méthode qui consiste à déterminer la plus petite quantité de sub-

stance capable de tuer, en un temps donné, l'unité de poids de l'animal expérimenté utilise des techniques multiples : aussi des définitions nombreuses et arbitraires peuvent être données de la dose minimum mortelle d'une substance suivant l'animal sur lequel on expérimente, la voie d'introduction de la drogue dans l'organisme et la durée de l'expérience.

D'après Burn [2], la valeur réelle de la dose minimum mortelle ne peut s'exprimer que par le chiffre qui représente la moyenne des doses minima mortelles obtenues dans un grand nombre d'expériences identiques : elle se caractérise par son invariabilité et ne change pas si on la calcule à nouveau en y ajoutant la moyenne de nouvelles expériences identiques.

Pratiquement, comme il n'est pas possible pour chaque essai biologique d'expérimenter avec un nombre considérable d'animaux, on prend la moyenne des doses minima mortelles obtenues dans quelques expériences et on calcule, en se basant sur les données des statistiques, l'erreur maximum que l'on peut commettre.

Le choix de l'animal sur lequel on expérimente étant fixé, les deux techniques suivantes permettent de déterminer la dose minimum mortelle d'une substance : injection unique qui peut être soit trop faible, soit trop forte, ce qui nécessite de répéter l'expérience sur un grand nombre d'animaux ; injection lente et progressive d'une solution de la substance de telle sorte que d'emblée l'expérience fournit un chiffre représentant la quantité minimum nécessaire pour produire la mort.

Méthode d'injection unique, sous-cutanée ou intraveineuse. — Cette technique a été appliquée dans le dosage des substances digitaliques, digitale, strophantus, scille. Les animaux expérimentés sont divisés en un certain nombre de groupes égaux ; on injecte à tous les animaux d'un groupe une dose identique et chaque groupe reçoit une dose différente. On attend un laps de temps arbitrairement fixé, puis on examine l'état des animaux expérimentés. On note la plus petite dose qui a tué, sans excep-

tion, tous les animaux et on la considère comme la dose minimum mortelle. La même expérience est répétée un certain nombre de fois ; on note dans chaque expérience la dose minimum mortelle et on prend la moyenne des doses minima mortelles partielles.

Calcul des erreurs. — Au point de vue pratique, il est non seulement nécessaire de calculer l'erreur maximum que l'on peut ainsi commettre, mais encore, de fixer le nombre d'animaux sur lesquels on doit expérimenter pour faire un dosage suffisamment précis.

Burn et Trevan [3] ont montré que pour chaque détermination il est possible de calculer « l'écart individuel moyen » qui représente la moyenne des erreurs que l'on est susceptible de commettre quand on diminue le nombre des essais :

Soit « n » le nombre d'expériences effectuées, « d » la moyenne des écarts entre chacune des doses minima mortelles et la dose minimum mortelle moyenne « M ».

L'écart individuel moyen calculé par la méthode du carré des erreurs est donné par la formule $E = \sqrt{\frac{d^2}{n(n-1)}}$.

Les calculs basés sur les statistiques indiquent que dans une série de « n » dosages, la valeur $M \pm E$ est sujette à erreur une fois sur trois, la valeur $M \pm 2E$ une fois sur 22 et la valeur $M \pm 3E$ une fois sur 370. Si l'on considère pratiquement 3E comme l'erreur maximum on peut en déduire l'erreur maximum pour cent qui est donnée par la formule $\frac{300\ E}{M}$. Pratiquement la connaissance de l'erreur maximum pour cent permet de juger la valeur ou l'insuffisance d'un essai et de conclure à la nécessité d'effectuer ou non un plus grand nombre d'expériences.

Méthode de perfusion lente. — Cette méthode a été appliquée au dosage des substances digitaliques. Elle consiste à perfuser par voie intraveineuse une solution de la substance à examiner préparée dans des conditions bien définies. La perfusion se pro-

longe jusqu'à la mort de l'animal. Cette méthode qui se montre comme une des plus pratiques et des plus sûres permet, comme nous l'avons déjà fait remarquer, d'obtenir d'emblée la dose minimum mortelle. Nous n'insisterons pas ici sur les conditions expérimentales auxquelles il faut se conformer pour effectuer ces déterminations et qui seront décrites avec précision dans le chapitre I de la deuxième partie de ce travail, mais nous indiquerons comment il est possible d'évaluer les erreurs que l'on peut commettre dans la pratique courante de ce dosage.

Calcul des erreurs. — Tout d'abord se pose la question de savoir si l'on doit calculer la dose minimum mortelle en prenant la moyenne de tous les essais, même si certaines déterminations ont été effectuées sur des animaux particulièrement résistants ou particulièrement sensibles. Or, d'une part, certains auteurs, Lind Van Wijngaarden [4], Eggleston et Carry [5] éliminent systématiquement ces chiffres des moyennes, notamment lorsque l'écart moyen pour cent, calculé en tenant compte des déterminations aberrantes, dépasse une valeur arbitrairement fixée d'après certaines règles mathématiques[1]; d'autre part, quelques auteurs, au contraire, Burn [2], Trevan [3] et Haskell [6] s'appuyant sur les calculs de probabilité et les statistiques tiennent compte dans les moyennes de toutes les données expérimentales. Nous-mêmes, dans nos essais de dosage des médicaments digitaliques, avons adopté ce dernier principe.

Lind Van Wijngaarden [4] formule au sujet de ces dernières méthodes de dosage appliquées aux drogues digitaliques quelques règles que nous tenons à signaler bien qu'elles nous paraissent plus arbitraires que celles qui reposent sur la notion de l'écart individuel moyen envisagée ci dessus, mais qui offrent l'avantage de calculer la précision d'un dosage au fur et à mesure qu'une nouvelle expérience est effectuée. Cet auteur estime que pour se contenter dans de tels dosages de « *n* » déterminations

1. Ces règles ont été formulées par Chauvenet, *Manul of Spherical and Practical Astronomy*.

il faut que l'écart moyen pour cent soit inférieur à $a\sqrt{n-1}$.

La lettre « a » représentant l'erreur maximum pour cent. Lind Van Wijngaarden a choisi pour « a » la valeur 6,67 qui est la moitié de l'écart moyen pour cent calculé dans une série d'expériences effectuées, par lui, sur 573 chats.

Si l'écart moyen pour cent dépasse cette valeur il faut expérimenter sur un plus grand nombre d'animaux.

L'écart moyen « E » est défini comme la moyenne des écarts obtenus en faisant la différence entre la valeur d'une détermination et la moyenne « M » de l'ensemble des déterminations effectuées. L'écart moyen pour cent est donné par la formule $\frac{100E}{M}$.

2) **Détermination de la toxicité en tenant compte du pourcentage des mortalités.** — Cette méthode permet d'établir la toxicité d'une substance médicamenteuse sans avoir à déterminer la valeur de la dose minimum mortelle. Elle est basée sur les différences de sensibilité des divers animaux d'une même espèce, vis-à-vis des doses diverses de substance pourvu que leur administration soit faite toujours dans des conditions identiques. Les travaux de Trevan [3] ont montré qu'il est possible d'admettre, tout au moins, pour des doses voisines de la dose minimum mortelle que le pourcentage des mortalités varie proportionnellement aux doses administrées. Ainsi la sensibilité individuelle d'une même espèce qui fut considérée si longtemps comme un obstacle à la précision des dosages biologiques constitue le principe même d'une méthode de dosage.

Le principe de cette méthode a été appliqué aux dosages de la digitale, de l'insuline et au contrôle des arsénobenzènes.

Trevan administre à quelques groupes d'animaux des doses diverses de la substance étalon et note la mortalité pour cent qui se produit après un certain laps de temps arbitrairement choisi, chez les animaux ayant reçu la même dose. Il construit

une courbe dite de « mortalité » en portant en abscisse la dose administrée et en ordonnée le pourcentage des mortalités. Pour déterminer l'activité d'une substance par rapport à celle de l'étalon on injecte à un certain nombre d'animaux une certaine dose et on note les mortalités qui s'ensuivent. En utilisant la courbe de mortalité obtenue avec l'étalon correspondant on peut déduire du pourcentage des mortalités, la dose injectée. Il convient, bien entendu, dans de tels dosages, de n'utiliser autant que possible que des animaux d'une même souche, dont la sensibilité est éprouvée à diverses époques au moyen de l'étalon.

Pratiquement, il se pose souvent un problème un peu différent de celui qui consiste à mesurer exactement l'activité d'une substance médicamenteuse ; il s'agit simplement de vérifier si cette substance n'a pas une toxicité beaucoup plus forte ni une activité thérapeutique moindre que celle d'une préparation moyenne adoptée dans la pratique médicale. Dans ce cas le contrôle biologique peut être conduit comme suit : on injecte à un certain nombre d'animaux une ou deux doses déterminées et l'on note le pourcentage des mortalités obtenues. Des règles rigoureuses, déduites des calculs de statistiques, permettent de déterminer d'après les doses injectées le pourcentage des mortalités que l'on doit admettre pour qu'une substance soit déclarée suffisante, c'est-à-dire ne différant pas, par exemple, de plus de 15 à 20 pour 100 de l'étalon.

Calculs des erreurs. — Dans de tels dosages il est possible d'évaluer la probabilité de l'exactitude des recherches effectuées.

Si « n » est le nombre d'animaux auxquels on injecte la dose « d » et « r » le nombre d'animaux morts dans une série de « n » expériences, on peut calculer la probabilité « p » qui est représentée par le terme $(r+1)$ du binome $(p+q)^n$ dans lequel $q=1-p$, c'est-à-dire $\frac{n!}{r!(n-r)!}\, p^r\,(1-p)^{n-r}$.

Pour chaque valeur particulière de « n » et de « r » il a été

possible de calculer la probabilité « p » et d'établir des tables qui donnent d'emblée sa valeur numérique [7].

Ecart individuel moyen. — Il est aussi possible sans connaître la dose minimum mortelle de calculer l'écart individuel moyen (Burn) [2]. Soit « s » le pourcentage d'animaux survivants dans un essai et « t » le pourcentage des animaux morts ($t = 100 - s$), « N » le nombre des animaux utilisés.

$$\text{L'écart individuel moyen « E »} = \frac{\sqrt{s \times t}}{100\sqrt{N}} = \frac{\sqrt{s(100-s)}}{100\sqrt{N}}.$$

On peut admettre que l'erreur maximum pour cent est représentée par la formule 300 E.

II. *Méthodes de dosage basées sur l'étude de l'action spécifique d'une substance sur une fonction ou un appareil d'un animal intact.*

On utilise pour le dosage de quelques substances l'effet spécifique que ces substances exercent sur une fonction ou un appareil d'un animal convenablement choisi. C'est ainsi que l'on titre les extraits surrénaux en évaluant l'augmentation de pression artérielle qu'ils provoquent par injection intraveineuse chez le chien anesthésié ou le chat décapité, les alcaloïdes actifs de l'ergot en étudiant les effets de cette drogue sur l'utérus in situ du chien ou du chat, les antithermiques en mesurant la baisse de température qu'ils provoquent chez des animaux auxquels on a donné la fièvre, les anesthésiques locaux en déterminant la baisse de chronaxie du nerf lingual, tronc sensitif du réflexe linguo-maxillaire.

Calcul des erreurs. — Dans les cas envisagés ci-dessus, il est difficile d'établir des règles rigoureuses pour le calcul des erreurs maxima commises. Pour chaque technique il existe, à côté des erreurs inhérentes à la méthode même (sensibilité indi-

viduelle, variations saisonnières des animaux), celles qui dépendent de l'expérimentateur et des appareils. D'une façon générale pour que les dosages biologiques aient une certaine valeur il faut, autant que possible, expérimenter l'étalon et la substance à examiner sur le même animal. En ce qui concerne les extraits surrénaux, l'ergot, les antithermiques, cette recommandation est suivie ; mais elle est impraticable pour certaines substances, en particulier pour les anesthésiques locaux ; aussi est-il nécessaire dans ces conditions d'effectuer un grand nombre d'expériences et d'en prendre la moyenne. Le calcul de l'erreur maximum commise peut s'effectuer suivant les règles indiquées ci-dessus.

III. *Méthodes de dosage basées sur l'action d'une substance sur un organe isolé.*

De nombreuses substances médicamenteuses peuvent être dosées en comparant leur action spécifique sur un organe isolé à la même action produite par l'étalon correspondant. C'est ainsi que l'on utilise l'action de l'hypophyse et de l'ergot sur l'utérus vierge de lapin ou de cobaye, l'action de la digitale sur l'oreillette isolée de lapin, l'action inhibitrice de la narcotine sur l'intestin isolé de cobaye, l'action des myotiques et des mydriatiques sur l'œil énucléé de grenouille.

Calcul des erreurs. — Ici encore, il est préférable quand cela est possible d'effectuer le dosage comparatif de la substance et de l'étalon sur le même fragment d'organe isolé pour éliminer les variations de sensibilité des divers fragments d'organes.

Dans les cas où il n'est pas possible d'opérer comparativement avec l'étalon et la substance sur le même organe (ergot, myotiques et mydriatiques), il faut nécessairement faire un plus grand nombre d'expériences et prendre comme chiffre exprimant la valeur pharmacodynamique d'une substance celui

qui représente la moyenne des mesures effectuées. On calcule l'erreur maximum commise en se basant sur la notion de l'écart individuel moyen.

Enfin lorsque l'action de la substance peut être enregistrée graphiquement il est facile de se rendre compte par l'examen des graphiques de la sensibilité de la méthode et de calculer directement sur les tracés l'erreur maximum commise.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Dale, *Introduction of Methods of biological Assay* by J. H. Burn, Oxford University Press, 1928.
[2] J. H. Burn, *Methods of biological Assay, loc. cit.*
[3] J. W. Trevan, *Proc. of the Royal Soc. 101* ; 1927, 483.
[4] C. Lind van Wijngaarden, De Betrouwbaarheid van physiologische ijkingen uitgewerkt voor Digitalis Proefschrift, Utrecht, 1925. — *Archiv. f. exp. Path. und. Pharm. 113,* 1926, 52.
[5] C. E. Eggleston et Carry, *Amer. Journ. Pharm. 85,* 1913, 99.
[6] C. C. Haskell, *Journ. Pharm. exp. Therap. 33,* 1928, 207.
[7] F. M. Durham, J. H. Gaddum et J. E. Marchal, *Medical Research Council.,* London, 1929.

DEUXIEME PARTIE

PRINCIPAUX DOSAGES BIOLOGIQUES PRÉCONISÉS PAR LE COMITÉ D'HYGIÈNE DE LA SOCIÉTÉ DES NATIONS

CHAPITRE PREMIER

DROGUES DIGITALIQUES

DIGITALE

Les méthodes de dosage chimique des principes actifs de la feuille de digitale n'ayant pas donné jusqu'ici de résultats satisfaisants, les conférences internationales réunies par le comité d'hygiène de la Société des Nations ont préconisé le titrage physiologique de la poudre de digitale et éventuellement de ses différentes préparations, suivant les divers procédés dont nous indiquons les techniques ci-dessous. D'ailleurs, quelle que soit la technique utilisée, la toxicité des différents échantillons est toujours donnée non pas en valeur absolue mais comparativement à un étalon international, ce qui permet d'exprimer leur activité en unités internationales.

Étalon de digitale et unité internationale.

L'unité internationale représente l'activité spécifique contenue dans $0^{gr},1$ de poudre étalon, activité qui peut être déterminée sur un animal quelconque.

Cependant, comme avant l'adoption de cette unité, on avait coutume d'exprimer l'activité de la digitale et de ses préparations par un chiffre représentant le nombre des doses mortelles contenues dans 1 gramme de drogue pour 1 kilogramme d'un animal déterminé, on continue le plus souvent, actuellement, à utiliser les expressions anciennes d'unité grenouille, d'unité chat, d'unité cobaye, d'unité chien.

La première poudre étalon [1] fut préparée par le Pr Magnus conformément aux décisions de la conférence internationale de standardisation biologique réunie à Edimbourg.

La deuxième conférence internationale de Genève chargea, de nouveau, le Pr Magnus de préparer et de doser au moyen de la méthode de titrage sur le chat, le second étalon international qui fut composé d'un mélange de 10 poudres différentes. Son activité est telle qu'un gramme de poudre étalon contient 11,1 unités chat, 2 200 à 2 350 unités grenouille, 5,05 unités chien. La teneur en H^2O de cet étalon actuellement en usage est de 7 à 8 pour 100. La poudre standard en ampoules scellées de verre brun est conservée par le National Institute for Medical Research London et mise à la disposition des différents pays qui peuvent établir à partir de cette poudre un *étalon national*[2].

Depuis, la troisième conférence internationale de Francfort-sur-le-Mein décida, à la suite du décès du Pr Magnus, de confier au Pr Bijlsma la préparation d'une nouvelle poudre étalon. Le nouvel étalon qui sera utilisé après l'épuisement de l'étalon de 1925 devra être plus parfaitement desséché que l'ancien et sa teneur en eau ne devra pas dépasser 3 pour 100.

Méthodes biologiques de dosage.

Les commissions internationales recommandent soit la méthode utilisant la grenouille, méthode d'une heure, de quatre heures, de vingt-quatre heures, soit les méthodes de perfusion par voie intraveineuse chez les mammifères chat, cobaye,

1. La pharmacopée des États-Unis qui a prescrit pour la première fois en 1916 le titrage biologique de la digitale, a adopté comme étalon de tous les médicaments cardiaques l'ouabaïne cristallisée.

2. La Commission internationale de Francfort-sur-le-Mein estime que dans les dosages biologiques des poudres de digitale une tolérance de 15 pour 100 en plus ou en moins fournit pour la pratique courante une marge acceptable.

chien. Quant à la méthode de Trevan utilisant l'oreillette isolée de lapin et à celle de Mansfeld qui emploie un fragment de sinus veineux de grenouille, elles sont prises en considération par les commissions internationales mais non acceptées définitivement.

Nous étudierons successivement ces différentes techniques ainsi que celles de Focke et de Trevan en laissant de côté les méthodes cliniques de dosage. Toutes les méthodes décrites ci-dessous sont basées sur deux des principes signalés dans la première partie de ce travail, à savoir la détermination de la toxicité et l'action spécifique de la digitale et de ses préparations sur un organe isolé.

1. *Méthodes basées sur la détermination de la toxicité de la digitale.*

1) ***Essai sur la grenouille.*** — Les méthodes utilisant la grenouille étant très nombreuses, nous décrirons seulement celles qui sont employées le plus fréquemment.

a) **Méthode d'une heure.** — Rendue officielle par la Pharmacopée des États-Unis, pour la standardisation de la digitale, du strophantus, de la scille et de leurs préparations officinales, cette méthode consiste en la détermination de la dose minimum mortelle par gramme d'animal qui amène l'arrêt systolique du ventricule de grenouille en un temps inférieur à une heure. La technique utilisée est très simple mais elle exige un nombre considérable d'animaux ; de plus, les principes actifs sont injectés à l'état d'émulsion plutôt qu'à l'état de solution ; enfin l'influence saisonnière joue un rôle important sur la sensibilité des animaux utilisés.

Préparation du produit injectable [1]. — La substance à doser peut être soit une poudre, soit une teinture

La préparation du produit injectable à partir d'*une poudre de digitale* doit être effectuée sur une poudre de digitale séchée sur de l'acide sulfurique jusqu'à poids constant. Un gramme de cette poudre est agité avec 25 centimètres cubes d'alcool absolu dans un flacon sphérique fermé, d'un volume de 100 centimètres cubes. On fait alors bouillir sous réfrigérant à reflux, pendant trente minutes, le mélange chauffé au bain de sable avec la plus petite flamme possible. Le mélange encore chaud est filtré. Le résidu est lavé sur le filtre avec de l'alcool absolu jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Les divers filtrats sont lentement évaporés au bain-marie dans un vase taré en évitant d'évaporer à sec. L'extrait ainsi concentré est transféré pendant qu'il est encore chaud dans un flacon gradué puis dilué au volume initial avec du sérum physiologique. De cette manière on obtient une solution émulsionnée verte qui peut être injectée.

Cette préparation doit être comparée avec une préparation similaire obtenue à partir de la poudre étalon de digitale ou avec une solution d'ouabaïne étalon.

La préparation de la *teinture de digitale* s'effectue de la façon suivante ; le volume qu'occupent 10 grammes de teinture officinale est réduit de moitié au bain-marie sans que la température dépasse jamais 50°. La liqueur résiduelle est introduite dans un ballon jaugé ; par addition de sérum physiologique on obtient un volume total de 25 centimètres cubes. On exprime la valeur de la teinture ainsi préparée par rapport à celle d'une teinture de poudre étalon soumise simultanément, dans les mêmes conditions, aux mêmes essais.

Préparation de l'animal. — Les grenouilles que l'on peut utiliser, Rana temporaria ou jupiens [1], doivent peser environ 40 grammes. Elles sont conservées quelques jours avant l'expérience dans de petits bacs placés dans un réservoir de fer galvanisé rempli d'eau à 20°. Une heure avant l'essai, les grenouilles

1. La pharmacopée des États-Unis recommande d'utiliser Rana jupiens pesant de 20 à 30 grammes.

sont placées dans des aquariums remplis d'eau maintenue à 20° pendant toute la durée de l'expérience. Il était autrefois recommandé de n'utiliser que les mâles, mais d'après les récents travaux de Trevan il semble qu'il suffit d'écarter les femelles à l'époque du frai.

Injection à l'animal. — Les grenouilles dont la peau est sommairement séchée et dont la vessie est vidée sont pesées. On injecte des dilutions différentes de la teinture à examiner à raison de 4 à 6 grenouilles pour chaque dose. L'injection peut s'effectuer soit dans le sac lymphatique ventral (Trevan) soit dans le sac lymphatique thoracique (Dooley et Higley) [2] soit par voie intraveineuse en une seule injection (Smith et Mac Closky) [3], (Gottlieb [4], Behrens [5]) ou en plusieurs injections dans la partie caudale de la veine abdominale antérieure (Trevan et Ellen Boock [6]).

Ces différentes techniques ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. La méthode qui utilise l'injection dans le sac lymphatique thoracique à travers le plancher buccal offre l'avantage qu'aucune goutte de liquide ne peut s'échapper mais il n'est pas possible d'injecter plus de $0^{cm3},5$ de liquide ; la méthode d'injection intraveineuse très précise est d'une technique plus difficile.

Après injection, les groupes de grenouilles sont placés dans leurs réservoirs respectifs toujours maintenus à 20° ; 58 minutes après l'injection, le thorax de chaque grenouille est ouvert pour que l'on puisse examiner l'état du cœur. On sépare les grenouilles mortes dont le ventricule est en systole et l'oreillette dilatée, des grenouilles survivantes et on peut déterminer, soit la dose par gramme de grenouille qui tue toutes les grenouilles d'un même groupe, soit la dose moyenne comprise entre deux doses différant entre elles de 10 pour 100 dont l'une tue la totalité des animaux alors que la plus faible n'en tue qu'une fraction arbitrairement déterminée. Une expérience similaire est effectuée avec la poudre étalon et il est alors possible d'exprimer l'acti-

vité de la préparation examinée en fonction de la poudre étalon.

Il y eut de nombreuses discussions pour fixer le moment où l'on doit ouvrir les grenouilles pour examiner l'état de leur cœur. D'après Burn, les avantages et les inconvénients de chaque méthode semblent relativement peu importants comparés aux différences de sensibilité individuelle ou saisonnière des grenouilles.

Quoique la méthode d'une heure soit la méthode officielle de la Pharmacopée des États-Unis, de nombreux travailleurs ont trouvé que les méthodes de 4, 12, 24 ou 48 heures fournissent des résultats plus précis.

b) **Méthode de douze heures, de Houghton** [7]. — Cette méthode consiste en la détermination de la dose minimum par gramme de grenouille qui amène la mort de l'animal en 12 heures.

Sa technique, en tous points comparable à la précédente, en diffère cependant en ce que l'examen du cœur des grenouilles a lieu 12 heures après l'injection.

c) **Méthode de Focke** [8]. Cette méthode, l'une des plus anciennement employées, utilise des grenouilles rousses (Rana temporaria) capturées récemment pendant les mois de juillet, d'août et septembre.

Les grenouilles pesant de 25 à 30 grammes sont maintenues à 17°. On injecte dans les sacs lymphatiques soit dorsaux soit ventraux un infusé à 10 pour 100. On note le temps nécessaire à l'arrêt du cœur qui doit être compris entre 6 à 15 minutes.

La valeur toxique V de la préparation est calculée au moyen de la formule suivante $V = \frac{P}{DT}$ dans laquelle P est le poids de la grenouille, D la quantité de produit injecté ; T le nombre de minutes qui s'écoulent entre le moment de l'injection et celui où se produit l'arrêt systolique du cœur.

La toxicité ainsi déterminée est arbitraire et ne peut fournir

un renseignement précis que si elle est évaluée par rapport à la toxicité de la poudre étalon déterminée dans les mêmes conditions.

d) **Méthode de Trevan** [9]. — Cette méthode consiste à établir un rapport entre la dose injectée à un lot de gre-

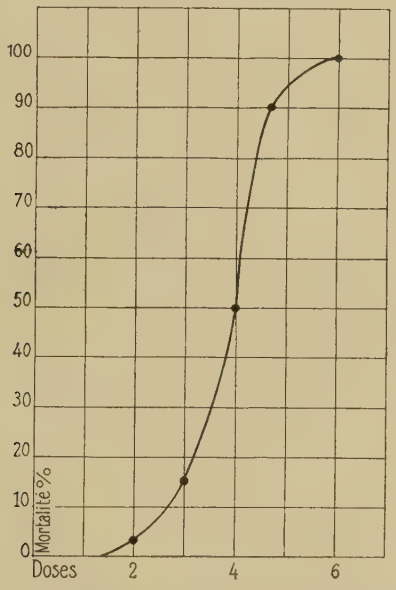

Fig. 1. — Courbe, dite de mortalité, (d'après Trévan) obtenue en injectant dans le sac lymphatique des grenouilles, des doses différentes de digitale et en observant le taux de mortalité qui en résulte 12 heures après. Dans cette courbe il a été donné arbitrairement la valeur 4 à la dose qui provoque 50 pour 100 de mortalité.

nouilles et le pourcentage de mortalité des grenouilles de ce lot.

On injecte 5 à 6 doses différentes de poudre étalon à 20, 30 ou 40 grenouilles. On note dans chaque groupe le nombre de grenouilles qui survivent douze heures après l'injection et on établit une courbe dite de mortalité en portant en abscisse la dose injectée et en ordonnées le chiffre représentant la mortalité pour cent. Il suffit, lorsque l'on veut connaître l'activité d'une poudre de digitale d'injecter une dose inférieure à la dose minimum

mortelle à une douzaine de grenouilles et de noter le pourcentage de mortalité obtenue. En utilisant la courbe de mortalité, on déduit à partir de cette valeur la dose injectée ; on fait deux ou trois séries de déterminations et on en prend la moyenne.

2) ***Méthode de perfusion continue.*** — Les méthodes de perfusion continue offrent sur les précédentes l'avantage de permettre l'injection d'une notable quantité de liquide et, par conséquent, de pouvoir solubiliser le maximum des principes actifs contenus dans la poudre de digitale. Au contraire, dans la méthode utilisant la grenouille, on est obligé d'injecter dans un sac lymphatique ou dans une veine une quantité limitée de liquide en solution concentrée ce qui peut impliquer une dissolution imparfaite des principes actifs. De plus les méthodes de perfusion lente permettent de déterminer sur un petit nombre d'animaux la dose qui provoque l'arrêt cardiaque, alors que les méthodes qui utilisent l'injection sous-cutanée ou intraveineuse d'une dose unique nécessitent un plus grand nombre d'animaux.

a) **Essai sur le chat.** — Cette méthode a été décrite par Hatcher et Brody [10] puis modifiée par Lind van Wijngaarden [11] qui expérimentait dans le laboratoire de Magnus. Elle consiste à injecter par perfusion continue dans la fémorale du chat soit la teinture au 1/5 que l'on dilue dans 20 fois son volume d'eau physiologique, soit l'infusé à 0,5 pour 100 préparé dans des conditions bien définies et à déterminer la dose minimum mortelle qui est la moyenne des doses minima mortelles obtenues sur un certain nombre d'animaux.

Préparation de l'infusé. — L'infusé doit être préparé selon les prescriptions de la pharmacopée hollandaise. 1ᵍ,25 de feuille de digitale sont introduits avec 250 cm³ d'eau dans un ballon placé dans un bain-marie à 90° ; le liquide étant constamment agité pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'infu-

sion est filtrée sur une fine mousseline et additionnée de 2g,25 de NaCl. La solution ainsi préparée est mise dans une burette de 100 centimètres cubes dont l'extrémité est en rapport avec un tube de caoutchouc fermé par une pince.

Préparation de l'animal. — On utilise des chats pesant de 1kg,7 à 2kg,7 auxquels on injecte par perfusion continue dans la fémorale un infusé de digitale qui provoque, après un certain temps, l'arrêt du cœur de l'animal. On détermine ainsi la dose nécessaire pour amener la mort par arrêt cardiaque dans un temps limité. Après anesthésie à l'éther de l'animal, on pratique la respiration artificielle et on entretient une anesthésie modérée à l'éther.

L'extrémité inférieure de la burette contenant l'infusé est reliée à la canule par un tube de verre en spirale qui plonge dans un bain-marie maintenu par un thermostat à la température de 37°. La vitesse d'écoulement qui est constante est choisie de telle façon que la durée de l'essai soit d'environ quarante minutes (trente à cinquante-cinq). On choisit la concentration du liquide de manière qu'il s'écoule environ 1 centimètre cube par miuute. On détermine la dose nécessaire pour amener l'arrêt du cœur. Cet arrêt qui est précédé d'une période de tachycardie et de convulsions asphyxiques, se reconnaît facilement par inspection et palpation du thorax. Au surplus on s'assure que le cœur ne bat plus en procédant à l'ouverture du thorax.

La détermination de la dose toxique s'effectue en prenant la moyenne d'un grand nombre d'essais. Le nombre de chats que l'on doit utiliser est déterminé suivant certaines règles basées sur des données statistiques.

La poudre étalon de 1925 a été préparée de telle sorte que la dose minimum mortelle soit de 89mg,7 par kilogramme de chat (la détermination a été faite sur 23 chats) ; Il s'ensuit que 1 gramme de poudre étalon contient 11,1 unités chat. L'écart moyen pour 100 calculé dans ces essais s'est montré inférieur à $6{,}67\sqrt{23-1}$ (voir 1re partie, page 15).

b) **Essai sur le chien.** — M. Tiffeneau, Jean Pichot et nous-même [12] nous sommes proposé d'appliquer au chien soit la méthode de dosage de Hatcher-Magnus déjà utilisée sur cet animal par Rowe [13], soit une modification de la méthode de Hatcher-Brody.

Méthode de Hatcher-Magnus. — Les chiens utilisés sont choisis de poids variant de 6 à 10 kilogrammes. Le sexe importe peu mais il faut éviter d'utiliser des femelles gravides ou des animaux malades ou exagérément gras.

Les animaux sont soumis à la respiration artificielle. L'anesthésie est obtenue préalablement par injection intraveineuse dans la saphène externe d'une solution à 1/100 de chloralose à raison de 12 centigrammes par kilogramme d'animal. On peut utiliser des infusés à 2,5 pour 100 ou à 1 pour 100 [1] soit la teinture diluée 10 fois. Le liquide dont on veut déterminer la toxicité est introduit par perfusion continue dans la veine fémorale de l'animal. Le débit de la solution est maintenu constant pendant toute la durée de l'expérience et il est réglé de telle sorte que la mort de l'animal survienne entre vingt-cinq et trente-cinq minutes. On détermine la dose minimum mortelle par kilogramme d'animal en prenant la moyenne d'un certain nombre d'essais.

Deux séries d'expériences sont exécutées les unes avec la poudre étalon les autres avec la poudre d'activité inconnue. On peut ensuite exprimer la puissance de cette dernière en fonction de l'activité de la poudre étalon. Les essais, effectués comme il a été indiqué ci-dessus, ont montré que la dose mortelle de l'étalon international pour le cœur de chien est de 198 milligrammes par kilogramme d'animal, donc 1 gramme de cet étalon contient 5,05 unités chien.

Exemple. — Nous donnons ci-contre, réunies dans les tableaux I et II les expériences [12] qui nous ont permis de doser une poudre de digitale A en fonction de l'étalon international.

1. Il semble préférable d'utiliser un infusé à 1 pour 100 (Jeanne Lévy et Pichot [12]).

Les expériences ont été effectuées soit avec un infusé à 1 pour 100, soit avec un infusé à 2,5 pour 100.

Tableau I.

Toxicité relative de l'étalon international 1925 *et d'une poudre de digitale* A, *déterminée avec un infusé à* 1 *pour* 100.

	NOMBRE D'EXPÉRIENCES.	DOSE MINIMUM MORTELLE moyenne en g. par kg. d'animal.	ÉCART INDIVIDUEL moyen.	ERREUR MAXIMUM pour 100.
Étalon international. . .	5	0,197	0,0202	30
Poudre de digitale A. . .	6	0,209	0,072	10

Les résultats consignés dans le tableau I permettent de conclure que la poudre de digitale A titre 93 pour 100 de l'étalon international.

Tableau II.

Toxicité relative de l'étalon international 1925 *et d'une poudre de digitale* A, *déterminée avec un infusé à* 2,5 *pour* 100.

	NOMBRE D'EXPÉRIENCES	DOSE MINIMUM MORTELLE moyenne en g. par kg. d'animal.	ÉCART INDIVIDUEL moyen.	ERREUR MAXIMUM pour 100.
Étalon international. . .	7	0,199	0,0095	13
Poudre de digitale A. . .	12	0,221	0,00583	7

Les résultats consignés dans le tableau II permettent de conclure que la poudre de digitale A titre 86 pour 100 de l'étalon international.

En faisant la moyenne des deux séries d'expériences on peut admettre que la poudre A titre $\frac{93+86}{2} = 89,5$ pour 100 de l'étalon international. On peut en déduire que $0^{g},1$ de la poudre A possède une activité correspondant à 0,895 unités internationales.

Modification de la méthode de Hatcher-Brody. — Une variante de la méthode ci-dessus décrite consiste à provoquer une partie de l'intoxication avec un poison d'activité constante comme l'ouabaïne et à achever l'intoxication avec l'infusé préparé à partir de la poudre à titrer. Une méthode similaire a déjà été employée sur le chat par Hatcher et Brody. On opère comme suit. On utilise deux burettes dont l'une est remplie d'une solution d'ouabaïne d'activité connue contenant $0^{mg},025$ d'ouabaïne par centimètre cube et dont l'autre contient l'infusé de digitale à 1 pour 100. On injecte une dose d'ouabaïne correspondant à 56 pour 100 de la dose mortelle d'ouabaïne soit $0^{mg},0065$ par kilogramme d'animal et par minute pendant 15 minutes et on termine l'intoxication en injectant l'infusé à titrer avec un débit tel que la mort de l'animal survienne de 13 à 17 minutes après le commencement de la perfusion de l'infusé. La même expérience est répétée un certain nombre de fois. On évalue la dose de digitale, par kilogramme d'animal, nécessaire à déterminer l'intoxication en prenant la moyenne d'une série d'essais. On opère identiquement de la même façon pour la poudre étalon. On évalue alors l'activité de la poudre A en fonction de la poudre étalon. Nous résumons dans le tableau III une série d'expériences illustrant cette méthode.

Tableau III.

Toxicité relative de l'étalon international 1925 et de la poudre de digitale A *déterminée par perfusion préalable d'une fraction de la dose mortelle d'ouabaïne.*

	NOMBRE D'EXPÉRIENCES	DOSE DE DIGITALE EN G. PAR KG. DE CHIEN nécessaire pour obtenir la mort après injection de 56 % de la dose mortelle d'ouabaïne	ÉCART INDIVIDUEL moyen	ERREUR MAXIMUM pour 100
Étalon international. .	3	0,154	0,0093	18
Poudre de digitale A. .	8	0,177	0,00695	11

Valeur pour cent de la poudre de digitale A par rapport à l'étalon international : $\frac{0{,}154 \times 100}{0{,}176} = 86$. On peut en déduire que $0^{g}{,}1$ de la poudre A possède une activité correspondant à 0,86 unités internationales.

Cette méthode se différencie de celle de Hatcher et Brody, d'une part parce qu'elle ne prend pas comme unité de mesure l'ouabaïne étalon mais la poudre de digitale étalonnée et d'autre part parce que l'ouabaïne est injectée primitivement.

c) **Essai sur le cobaye.** — Cette méthode préconisée par Knaffl-Lenz [14] est très semblable à celle qui utilise le chat ou le chien. Elle consiste à déterminer la dose minimum mortelle d'une solution de digitale injectée par perfusion continue dans la veine jugulaire d'un cobaye anesthésié et soumis à la respiration artificielle. Les cobayes utilisés pèsent de 580 à 800 grammes. Comme le cœur des cobayes est deux fois plus résistant à la digitale que le cœur de chat, on utilise des infusés de 1 à 2 pour 100.

Mais si les cobayes sont d'obtention plus aisée et d'un prix moins élevé que les chats et si la technique de la dissection de la trachée et de la veine jugulaire est simple, il semble bien que ces animaux sont sujets à de grandes variations de sensibilité individuelle surtout lorsqu'ils sont anesthésiés.

II. *Action spécifique de la digitale sur divers organes isolés.*

a) **Essai sur l'oreillette du lapin.** — Trévan, Boock, Burn, et Gaddum [15] ont utilisé l'oreillette du lapin qu'ils installent dans un bain contenant un liquide nourricier maintenu à température constante et traversé par un courant d'oxygène. L'oreillette communique ses mouvements à un système inscripteur

très sensible et très léger. On peut ainsi comparer sur le même organe l'action d'une teinture inconnue à la teinture préparée à partir de la poudre étalon. Les auteurs ont employé comme solution nourricière une solution qui a la composition suivante.

Nacl.	9 g.
KCl.	0g,42
$CaCl^2$ anhydre	0g,24
Dextrose.	1 g.
Solution d'acide borique [1].	17 cm³
Solution de borax $\left(\frac{M}{20}\right)$ [2].	3 cm³
Eau distillée.	1 000 cm³

L'oreillette détachée rapidement du cœur est suspendue dans le bain dans lequel elle reprend rapidement ses mouvements. Lorsque les mouvements de l'oreillette sont devenus uniformes, on ajoute au bain une dose de la teinture d'activité inconnue de laquelle l'alcool a été chassé et remplacé par du Ringer. On obtient quelques centimètres de tracé sur lesquels l'amplitude est considérablement augmentée. Le liquide contenu dans le bain est changé. Le cœur reprend son amplitude normale vingt-cinq minutes après ce lavage. On peut, à ce moment, ajouter au bain une dose égale de la teinture préparée à partir de la poudre étalon. On continue à ajouter alternativement l'étalon et la teinture de titre inconnu et l'on compare les différences d'augmentations d'amplitude obtenues avec les deux teintures.

On fait varier les doses de telle sorte que l'on obtienne successivement deux effets semblables, l'un avec l'étalon, l'autre avec la teinture à examiner. Si ce résultat ne peut être atteint, on mesure les augmentations d'amplitude obtenues avec chacune des doses utilisées et on applique la loi des proportions.

1. La solution d'acide borique est préparée en dissolvant 12g,4 d'acide borique dans 1 litre d'eau.

2. La solution M/20 de borax est préparée par dissolution de 19g,1 de borax dans 1 litre d'eau.

Cette méthode qui semble donner d'excellents résultats est très longue et très délicate.

b) **Essai sur le sinus du cœur de grenouille.** — Cette technique étudiée par Mansfeld et Horn [16] utilise comme test le sinus isolé du cœur de grenouille coupé en petits morceaux, Elle consiste d'ailleurs en une simple détermination de toxicité. Les morceaux de sinus sont placés pendant 8 à 10 minutes dans une solution de Ringer saturé d'oxygène, puis transportés dans des solutions d'infusé de digitale de concentrations diverses. Après une heure, on sélectionne soit à l'œil nu, soit à la loupe, soit encore au microscope si cela semble nécessaire, les morceaux de sinus qui ne battent plus. Cette expérience est effectuée avec des dilutions différentes de digitale et dans chaque dilution on place six morceaux de sinus du cœur de grenouille. On détermine la concentration limite pour laquelle, sur six préparations, quatre se sont arrêtées de battre. Le rapport des concentrations limites de la poudre à examiner et de la poudre étalon permet d'apprécier la valeur de la poudre d'activité inconnue.

Mansfeld et Horn utilisent comme étalon l'ouabaïne et évaluent à 25 pour 100 l'erreur maximum commise.

Très récemment Stasiak et Zboray [17] ont utilisé le sinus veineux de grenouille pour le dosage de la digitale en prenant comme étalon la poudre de digitale dont ils préconisent l'emploi.

STROPHANTUS

Le titrage des teintures de strophantus n'est pas différent de celui de la digitale et les mêmes méthodes d'essais biologiques ont pu être utilisées. La conférence de Genève recommande l'emploi comme étalon de la g-strophantine ou ouabaïne.

Étalon de strophantus.

La Conférence de Francfort-sur-le-Mein décida, en tenant compte de l'activité variable des divers échantillons d'ouabaïne due vraisemblablement aux variations de leur teneur en eau de cristallisation, qu'un échantillon type d'ouabaïne serait préparé et conservé et que cet étalon aurait une teneur en ouabaïne anhydre exactement précisée. Le Pr Tiffeneau fut chargé de préparer l'étalon ouabaïne et les essais de détermination de sa toxicité furent effectués par R. Cahen et nous-même [18].

L'ouabaïne étalon[1] a une teneur en H^2O de 19.94 pour 100 tandis que la teneur en H^2O calculé pour la formule $C^{30}H^{46}O^{12},9H^2O$ est 21.33 pour 100. La rotation spécifique du produit anhydre $\alpha_0 = -30°6$.

La dose minimum mortelle de l'étalon ouabaïne est pour le chien, par perfusion continue, d'une durée de trente minutes environ, suivant la méthode de Hatcher-Magnus, de 0mg,1364 par kilogramme d'animal pour l'ouabaïne anhydre, de 0mg,173 pour l'ouabaïne cristallisée à $9H^2O$ et de 0mg,1705 pour l'ouabaïne étalon contenant 19,94 pour 100 d'eau. Ainsi 1 milligramme d'ouabaïne cristallisée contient 5,78 unités chien.

La toxicité a été déterminée en effectuant la moyenne de deux séries d'essais[2] consignés dans le tableau IV. La solution utilisée contient 0mg,025 d'ouabaïne par centimètre cube. Elle est préparée en diluant au 1/100 dans l'eau distillée un centimètre cube d'une solution alcoolique d'ouabaïne obtenue en dissolvant 50 milligrammes d'ouabaïne dans 20 centimètres cubes d'alcool absolu.

1. L'ouabaïne étalon a été fourni par la firme Arnaud. Sa teneur moyenne en H^2O a été déterminée par une série d'essais effectués par M. Hasenfratz.

2. Ces essais ont été effectués avec deux échantillons de l'étalon dont l'un avait été abandonné à l'air libre. La teneur en H^2O de ces deux échantillons a été déterminée avant l'expérimentation hologique.

Les essais effectués sur le chat (Burn et Singh Grewal [19]) indiquent que la dose minimum mortelle d'ouabaïne étalon international est de $0^{mg},076$ d'ouabaïne cristallisée et de $0^{mg},061$ d'ouabaïne anhydre pour 1 kilogramme de chat; donc 1 milligramme d'ouabaïne cristallisée contient 13,1 unités chat et 1 milligramme d'ouabaïne anhydre contient 16,3 unités chat.

Tableau IV.

Nombre des essais.	20	7
Quantité d'ouabaïne cristallisée injectée par kg. et par minute (mg).	0,0063	0,0058
Teneur en H^2O pour 100 de l'étalon.	19,8	21,5
Dose minimum mortelle en ouabaïne expérimentée par kg. d'animal (mg.).	0,167	0,1778
Dose minimum mortelle en ouabaïne anhydre par kg. d'animal (mg.).	0,1339	0,139
Dose minimum mortelle en ouabaïne étalon à 19,94 pour 100 d'eau par kg. d'animal (mg.).	0,167	0,173

Dans les essais effectués comparativement à l'étalon ouabaïne il est nécessaire d'opérer, soit avec l'étalon rendu anhydre, soit avec l'ouabaïne étalon, dont on déterminera auparavant la teneur en H^2O de cristallisation.

L'étalon ouabaïne est conservé au National Institute for Medical Research London, par fractions de 100 milligrammes contenues dans de petites ampoules de verre hermétiquement closes.

Dosage des teintures de strophantus.

Tandis que la Pharmacopée des Etats-Unis U. S. P. X. indique que 1 centimètre cube de teinture de strophantus au 1/10 doit avoir une toxicité équivalente de $8^{mg},3$ d'ouabaïne, les essais effectués par Burn et Trevan en Angleterre sur la grenouille et le chat et par Raymond Cahen et nous-même en

France sur le chien ont montré que 1 centimètre cube des teintures de strophantus utilisés dans ces deux pays ont une toxicité correspondant à 3 ou 4 milligrammes d'ouabaïne étalon.

Essai sur la grenouille. — Pour déterminer la dose minimum mortelle d'ouabaïne étalon, il faut injecter aux grenouilles de 20 à 25 grammes $0^{mg},011$ à $0^{mg},014$ d'ouabaïne, soit des doses d'ouabaïne variant de $0^{mg},045$ à $0^{mg},055$ pour 100 grammes d'animal.

Quand on veut titrer la teinture de strophantus qui officiellement est préparée à 1/10, il faut la diluer dans 100 fois son poids de sérum physiologique ou d'eau distillée et injecter ensuite environ $0^{cm^3},5$ d'une telle solution par grenouille.

Essai sur le chat, le chien et le cobaye. — La teinture de strophantus doit être diluée de 900 fois son volume pour être administrée au chat, 250 fois pour le cobaye et 100 fois pour le chien. Elle est injectée, dans les conditions décrites ci-dessus, comparativement à l'étalon ouabaïne dont la solution utilisée a une concentration de 1/200 000 pour le chat, 1/60 000 pour le cobaye et 1/40 000 pour le chien.

Tableau V.

TEINTURES	NOMBRE D'EXPÉRIENCES	ACTIVITÉ D'UN cm^3 DE TEINTURE AU 1/10 exprimée en mg. d'ouabaïne étalon	ACTIVITÉ D'UN cm^3 DE TEINTURE AU 1/10 exprimée en mg. d'ouabaïne anhydre
A	6	3,97	3,17
B	4	3,89	3,12
C	4	3,58	2,87

Nous indiquons dans le tableau V les résultats que nous avons obtenus avec trois teintures de strophantus[1] préparées à partir

1. Expériences non publiées (Jeanne Lévy et Raymond Cahen).

du strophantus hispidus. Ces teintures sont diluées jusqu'à 100 fois leur volume avec de l'eau distillée. Leur toxicité est déterminée par perfusion intraveineuse lente chez le chien.

Les résultats ci-dessus exposés, obtenus avec les teintures de strophantus, indiquent que la valeur moyenne des trois teintures de strophantus titrés ci-dessus est telle que 1 centimètre cube de teinture possède une activité égale à $3^{mg},05$ d'ouabaïne étalon anhydre. Les résultats obtenus par Burn et Grewal sur diverses teintures de strophantus leur ont fourni des valeurs un peu plus élevées.

SCILLE

Pour ce qui concerne les titrages biologiques des préparations à base de scille, ils peuvent être effectués au moyen de techniques nombreuses, identiques à celles qu'on emploie pour les préparations de digitale ou de strophantus ; la seule difficulté consiste à choisir un étalon convenable. D'après Dale et Burn, l'ouabaïne ne peut être utilisée comme étalon pour la scille. Les commissions internationales ont envisagé la possibilité de créer un étalon international pour la scille et ses préparations à partir d'un échantillon approprié de cette substance. Comme la préparation de cet étalon n'est pas encore effectuée il serait peut-être possible de prendre actuellement comme étalon l'un ou l'autre des glucosides isolés du scille, l'un à l'état cristallisé le scillarène A ; l'autre le scillarène B amorphe, soluble dans l'eau, qui semble être un mélange de deux substances.

Nous donnons ci-dessous les toxicités relatives des deux scillarènes A et B sur la grenouille, le chat et le chien.

Étalon de scille.

La toxicité du *scillarène* A est de 1 000 unités grenouilles et de $0^{mg},226$ par kilogramme de chat (Rothlin [20]). Nous

avons déterminé la toxicité de ce glucoside[1] sur le chien par perfusion lente par la méthode de Hatcher-Magnus et nous avons trouvé[2] qu'elle est de $0^{mg},353$ par kilogramme de chien (Cette détermination a été faite sur 6 chiens). Ainsi 1 milligramme de scillarène A contient 4,42 unités chat et 2,8 unités chien.

La toxicité du *scillarène* B est de 1 600 unités de grenouilles et de $0^{mg},144$ par kilogramme de chat (Rothlin). Nous avons déterminé la toxicité de ce glucoside sur le chien, par perfusion lente par la méthode de Hatcher-Magnus et nous avons trouvé qu'elle était de $0^{mg},167$ par kilogramme de chien. Cette détermination a été faite sur 7 chiens. Ainsi 1 milligramme de scillarène B contient 6,94 unités chat et 5,9 unités chien.

Dosage des teintures de scille.

Essai sur la grenouille. — La teinture au 1/5 pour être titrée doit être diluée de dix fois son volume après que l'alcool qui y est contenu a été évaporé au bain-marie et remplacé par du sérum physiologique. Il faut injecter à une grenouille de 20 grammes 0.5 à 1 centimètre cube de teinture ainsi diluée.

Lorsqu'on désire déterminer la dose minimum mortelle du scillarène, il faut utiliser une solution de scillarène dans le sérum physiologique; on injecte à une grenouille de 20 grammes[3] 1 centimètre cube d'une solution à 1/70 000.

Essai sur le chat, le chien et le cobaye. — La teinture doit être diluée 4 fois pour être administrée au chat, 20 fois pour le chien, 15 fois pour le cobaye.

Nous indiquons dans le tableau VI les résultats que nous avons obtenus avec deux teintures de scille de provenances diverses.

1. Les deux échantillons de scillarène A et B nous ont été fournis par la firme Sandoz.
2. Expériences non publiées (Jeanne Lévy et Raymond Cahen).
3. Expériences non publiées (Jeanne Lévy et Raymond Cahen).

La toxicité a été déterminée par la méthode de perfusion lente chez le chien.

Tableau VI.

TEINTURES	NOMBRE D'EXPÉRIENCES	DOSE MINIMUM MORTELLE PAR KG. d'animal en cm^3 de teinture au 1/5	DOSE MINIMUM MORTELLE PAR KG. d'animal en mg. de scille	ACTIVITÉ DE UN CM^3 DE TEINTURE au 1/5 exprimé en mg. de scillarène A
A	4	0,194	38,9	1,8
B	4	0,214	42,8	1,64

BIBLIOGRAPHIE

[1] *League of Nations Publications* (532 M) *189,* 1926, C. H. 350.

[2] M. S. Dooley et C. D. Higley, *Journ. Am. Pharm. Assoc. 11,* 1922, 911.

[3] M. I. Smith et Mc Closky, *Public Health Report.* Washington, sup. n° 52, 1925.

[4] R. Gottlieb, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 83,* 1918, 117.

[5] Behrend-Behrens, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 140,* 1929 ; 237.

[6] J. W. Trevan et Ellen M. Boock, *Quarterly Journ. of Pharm.* 1928, 16. — J. W. Trevan, *Bioch. Journ. 19,* 1925, 1111.

[7] E. M. Houghton, *The Lancet. 19,* 1909.

[8] C. Focke, *Archiv. der Pharm. 241,* 1903, 128 ; *245,* 1904, 240 ; *247,* 1909.

[9] J. W. Trevan, *Proc. Roy. Soc. 101,* 1927, 483.

[10] R. A. Hatcher et Brody, *Journ. Amer. Pharm. Assoc. 82,* 1910, 362.

[11] C. Lind van Wijngaarden, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 112,* 1926, 252 ; *113,* 1926, 40 ; *114,* 1926, 21 ; *123,* 1927, 215.

[12] M. Tiffeneau, Jeanne Lévy et J. Pichot, *Paris Médic. 18,* 1928, 562 ; Jeanne Lévy et J. Pichot, *Bul. Sciences Pharm. 36,* 1929, 593 ; Jean Pichot, *Thèse d'Université Pharmacie,* 1929. Imprimerie de la Cour d'appel.

[13] L. W. Rowe, *Journ. Am. Pharm. Assoc. 8,* 1919, 900.

[14] E. Knaffl-Lenz, *Journ. Pharm. Exp. Ther. 29,* 1926, 407.

[15] J. W. Trevan, E. M. Boock, J. H. Burn et J. R. Gaddum, *Quarterly Journ. of Pharm.* 1928, 10.

[16] G. Mansfeld et S. Horn, *Archiv. exp. f. Path. u. Pharm. 132,* 1928, 257.

[17] Stasiak et B. Zboray, *Arch. exp. f. Path. u. Pharm. 144,* 1929, *283.*

[18] Jeanne Lévy et Raymond Cahen, *Paris Medic. 19,* 1929, 587.

[19] J. B. Burn et K. Singh Grewal, *Quarterly journ. of Pharm. and Pharmacologie 2,* 1929, 404.

[20] E. Rothlin, *Schweiz. Medic. Wochens. 57,* 1927, 1171.

CHAPITRE II

ADRÉNALINE ET EXTRAITS SURRÉNAUX

Bien que le principe actif des extraits surrénaux, l'adrénaline, soit bien défini au point de vue chimique, les commissions internationales réunies à Edimbourg et à Genève ont préconisé, pour ces préparations, un dosage biologique qui permet de déceler, sur une quantité minime de substance, un degré d'impureté difficile à évaluer jusqu'ici par les méthodes chimiques ou physiques.

La méthode utilisée pour effectuer ces dosages consiste en la détermination des doses d'une poudre étalon et d'une poudre d'activité inconnue capables de produire sensiblement les mêmes effets sur la pression artérielle d'un mammifère.

Étalon.

Il n'existe jusqu'ici aucun étalon international. On peut utiliser le 3,4 dioxyphénylméthylaminoéthanol

$$(OH)^2C^6H^3 - CHOH - CH^2 - (NH)CH^3$$

(adrénaline, épinéphrine, suprarénine), lévogyre, cristallisé, synthétique ou naturel dont on a soigneusement vérifié la pureté par analyse chimique et par détermination de son pouvoir rotatoire spécifique.

Dosage biologique des extraits surrénaux et des adrénalines commerciales.

Cette méthode biologique est basée sur les recherches de Cushny [1] qui ont montré que sur un même animal, les variations de la pression artérielle sont, dans une certaine mesure, proportionnelles aux doses d'adrénaline injectées par voie intraveineuse. Elle a été appliquée soit au chien ayant reçu de l'atropine (États-Unis) soit au chat décapité et privé de la moelle suivant la méthode de Sherrington (Grande-Bretagne).

1. ***Essai sur le chien.*** — Nous décrirons la méthode que nous avons toujours utilisée au laboratoire de pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris et qui a été mise au point par M. Tiffeneau [2].

Préparation de l'animal. — Le chien est anesthésié au moyen d'une injection de chloralose pratiquée dans la veine saphène externe préalablement dénudée et dans laquelle on a introduit une canule munie d'un mandrin. On injecte par cette canule à raison de 12 centigrammes par kilogramme d'animal une solution au 1/100 de chloralose dissous dans du sérum physiologique.

Dès que l'animal est profondément endormi ce qui demande de 5 à 10 minutes au maximum, on isole la carotide dans laquelle on introduit une canule de verre stérilisée mise en relation, au moyen d'un tube en caoutchouc rempli de liquide anticoagulant, avec un manomètre à mercure. Le manomètre est muni d'un style inscripteur qui enregistre les oscillations de la pression artérielle sur un papier noirci avec du noir de fumée, fixé sur un cylindre enregistreur.

Le liquide anticoagulant que nous utilisons possède la composition suivante :

Sulfate de soude cristallisé.	100 g.
Sulfate de magnésie cristallisé.	100 —
Eau distillée.	800 cm³

L'animal ainsi préparé reçoit une dose de $0^{mg},05$ à $0^{mg},10$ de sulfate d'atropine par kilogramme suffisante pour paralyser le pneumogastrique. On peut vérifier que le vague est paralysé en l'excitant électriquement.

Préparation des solutions d'adrénaline et de surrénales. — On utilise généralement des solutions d'adrénaline dont le titre varie de 1/10 000 à 1/100 000 préparées à partir d'une solution mère au 1/100. Cette solution s'obtient à partir d'une quantité pesée d'adrénaline base dissoute dans une solution d'acide chlorhydrique dilué. De toutes façons, le *p*H des solutions d'adrénaline à 1/100 que l'on désire conserver quelques jours doit être inférieur à 6,4.

Les préparations de surrénales à examiner peuvent être soit en solution injectable, soit en poudre. Pour ce qui concerne les préparations injectables on les utilise directement. Quant aux préparations non injectables on les fait macérer pendant une heure après les avoir diluées avec 30 à 50 fois leur poids d'eau bouillie, tiède, légèrement acidulée. On peut exprimer la teneur en adrénaline soit de la poudre sèche, soit de la glande fraîche suivant les sortes de préparations [3].

Mode opératoire du dosage. — La sensibilité des divers chiens utilisés dans ces essais est essentiellement variable ; aussi faut-il déterminer préalablement, avant de commencer l'expérience, la dose d'adrénaline capable de produire un effet suffisant. On utilise des solutions étalons variant de 1/10 000 à 1/100 000 suivant la sensibilité de l'animal envisagé. On cherche en tâtonnant à obtenir sur le graphique une élévation artérielle de 6 à 8 centimètres ce qui correspond à une augmentation de pression de 12 à 16 centimètres de mercure.

Quand on a injecté la dose fournissant l'effet cherché on s'assure de la constance de cet effet en répétant trois ou quatre fois de suite la même dose dès que la pression a de nouveau atteint son taux normal ce qui demande de 3 à 4 minutes.

Les injections qui s'effectuent dans la saphène externe doivent

être faites rapidement et suivant toujours la même technique. C'est ainsi, qu'après chaque injection d'adrénaline, on remplit la seringue qui a servi à l'injection avec 1 à 2 centimètres cubes de sérum physiologique que l'on injecte rapidement. Ce liquide sert à la fois à rincer la seringue et la canule. A cette condition il est possible d'injecter dans la même veine le produit à doser et la solution étalon[1].

Quand on a fixé la dose active de l'étalon et qu'on s'est assuré de la constance de ces effets, on cherche à déterminer, toujours par tâtonnement, la dose de la solution à examiner qui produit un effet identique. Quand cette dose est fixée, on l'injecte plusieurs fois de suite, puis on intercale cette dose ou des doses très voisines entre deux injections de solution étalon. On a soin d'arrêter le cylindre dès que le maximum de pression est atteint de manière à obtenir un graphique sur lequel les courbes à comparer sont proches l'une de l'autre. Il est possible d'injecter à un même animal de 15 à 20 doses produisant une élévation de pression de 12 à 16 centimètres de mercure et d'obtenir des résultats comparables à eux-mêmes.

Lorsque l'opération est terminée et que le tracé est fixé au vernis, on compare les hauteurs des graphiques par superposition des diverses courbes et on déduit l'activité de la préparation à examiner en fonction de celle de l'étalon. La sensibilité de cette méthode est très grande et les erreurs commises ne dépassent par 5 pour 100 [3].

Exemple : Comparaison de deux échantillons d'adrénaline. — Il a été utilisé comme étalon un échantillon d'adrénaline dont la pureté chimique a été vérifiée et dont le pouvoir rotatoire a été préalablement déterminé. Il a été préparé à partir de l'étalon une solution à 1/100 en dissolvant l'adrénaline base dans de l'eau chlorhydrique. A partir de cette solution mère on

1. Il n'est pas nécessaire dans ces conditions d'opérer comme les auteurs américains, qui préparent les deux saphènes dont l'une sert à injecter la solution étalon et dont l'autre est réservée aux solutions à examiner.

prépare une solution à 1/10 000. La solution à examiner est de même diluée à 1/10 000.

On expérimente sur un chien pesant $12^{kg},300$ et ayant reçu 7 milligrammes de sulfate d'atropine.

Les tracés obtenus enregistrant les variations de la pression artérielle sont représentés sur la figure 2.

Après avoir, dans un certain nombre d'essais, éprouvé l'animal en injectant cinq fois de suite la dose de $0^{mg},05$ de l'étalon et avoir noté la constance des effets produits par les trois dernières injections, il a été injecté en 2, 3, 5, 6, 8, 9, des doses différentes mais voisines de l'échantillon X soit $0^{mg},05$, $0^{mg},06$, $0^{mg},065$ et en 1, 4, 7, $0^{mg},05$ de l'étalon. La superposition des courbes 7, 8, et 9 montre que $0^{mg},05$ de l'étalon possèdent une activité analogue à $0^{mg},065$ de la substance X.

On peut déduire que l'adrénaline X titre $\frac{500}{65} = 77$ pour 100 de l'étalon.

On diminue encore l'erreur maximum en faisant un certain nombre de dosages et en prenant leur moyenne.

2. ***Essai sur le chat décapité.*** — Cette méthode appliquée par Barger et Dale [4] utilise la technique de Sherrington [5] qui est délicate et nécessite une grande habitude de la part de l'opérateur.

On choisit un chat mâle adulte pesant de 3 à 4 kilogrammes. L'anesthésie qui est obtenue au moyen du chloroforme est maintenue par une canule trachéale. Les deux carotides sont ligaturées, l'animal est couché sur le ventre, les jambes fixées, la tête libre. On pratique une incision cutanée médiane, allant du sommet de la tête aux épaules. Un opérateur tient la tête du chat de telle sorte que les muscles du cou soient tendus et qu'on puisse facilement les inciser sur le plan médian sur une longueur de 5 à 6 centimètres ; on dégage les muscles de chaque côté de la crête de la deuxième vertèbre cervicale et on les coupe ainsi que l'axe neural jusqu'à ce qu'on atteigne les méninges. On

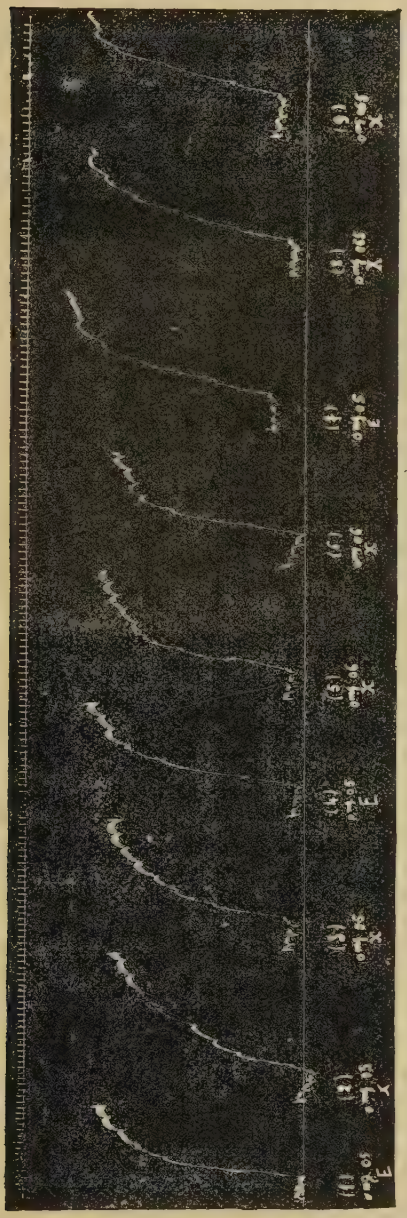

Fig. 2. (réduite de 1/2). — Action de deux échantillons d'adrénaline sur la pression artérielle d'un chien ayant reçu de l'atropine (E, adrénaline étalon, à la concentration de 1/10 000e ; X, échantillon d'adrénaline à titrer à 1/10 000e).

sectionne la moelle, on introduit par le trou occipital une sonde pour détruire l'encéphale, puis on ferme le trou occipital au moyen de plasticine. L'anesthésie doit être profonde afin de diminuer autant que possible les hémorragies qui sont d'ailleurs arrêtées soit au moyen de plasticine, soit au moyen de tampons de coton trempés dans de l'eau salée et appliqués pendant quelques minutes sur les plaies musculaires ou médullaires.

On peut ensuite placer l'animal sur le dos et le préparer pour enregistrer sa pression carotidienne qui est d'ailleurs le plus souvent assez basse après cette opération.

Quant au mode opératoire du dosage proprement dit, il n'est pas différent de celui qui utilise le chien et qui a été décrit ci-dessus.

BIBLIOGRAPHIE

[1] A. R. Cushny, *Journ. of physiol. 37*, 1908, 130.
[2] M. Tiffeneau, *C. R. Ac. Soc. 161*, 1916, 36.
[3] M. Tiffeneau, *Journ. de Pharm. et de Chim. 23*, 1921, 313 et 366.
[4] G. Barger et H. H. Dale, *Journ. of physiol. 41*, 1910, 19.
[5] Sherrington, *Journ. of Physiol. 38*, 1908, 375.

CHAPITRE III

PRÉPARATIONS DE LOBE POSTÉRIEUR D'HYPOPHYSE

Les préparations de lobe postérieur d'hypophyse agissent sur diverses fonctions de l'organisme, aussi ont-elles des emplois très variés en clinique où on les utilise tour à tour comme stimulant de l'inertie utérine, hémostatique et antidiurétique dans le diabète insipide.

Comme la composition de telles préparations est inconnue, il n'est pas possible de procéder à leur titrage chimique. Seul leur dosage biologique a pu être envisagé ; afin d'évaluer l'activité d'une préparation de lobe postérieur d'hypophyse, on a cherché à utiliser des tests différents en prenant comme base l'une de ses nombreuses actions pharmacodynamiques sur la pression artérielle, sur la coagulation sanguine, sur le muscle utérin isolé, sur la sécrétion urinaire (action diurétique ou antidiurétique suivant les conditions), sur les mélanophores, sur la sécrétion lactée. Nous n'exposerons ici que les méthodes utilisant l'action hypertensive, l'action sur l'utérus et l'action antidiurétique en laissant de côté celles qui sont basées sur les actions mélanophoriques et galactophores qui titrent dans l'hypophyse des principes qui semblent n'avoir aucun rapport avec ceux qui sont employés en thérapeutique.

Les récentes expériences discutées devant la commission internationale réunie à Francfort-sur-le-Mein paraissent avoir montré que le pouvoir ocytocique, le pouvoir hypertenseur et

peut-être même le pouvoir antidiurétique de l'hypophyse sont dus à des principes actifs différents. Dans ces conditions, si ces faits sont ultérieurement prouvés par de nouvelles expériences, il faudra exprimer l'activité d'une poudre d'hypophyse non seulement en unités ocytociques et hypertensives comme le recommandent déjà les commissions internationales mais aussi en unités antidiurétiques.

On utilisera pour ces déterminations, soit une préparation unique, soit trois préparations obtenues différemment à partir de la poudre et contenant isolément les principes ocytociques, hypertenseurs, antidiurétiques.

Activité ocytocique. — Pour ce qui concerne l'évaluation de l'activité ocytocique d'un extrait d'hypophyse, les commissions internationales préconisent la méthode de Dale, Laidlaw [1] et Burn [2] sur l'utérus de cobaye vierge. Mais à côté de cet essai, elles recommandent d'effectuer simultanément un deuxième essai en vue de déceler toute action stimulante non spécifique de l'hypophyse sur l'utérus, action due probablement à l'histamine.

Activité hypertensive. — L'évaluation de l'activité hypertensive d'un extrait hypophysaire peut être faite suivant les recommandations des commissions internationales, à l'aide d'essais comparatifs sur le chien anesthésié ou sur le chat décapité.

Activité antidiurétique. — Quant à l'activité antidiurétique de l'extrait d'hypophyse les commissions internationales n'expriment aucune opinion ferme en ce qui concerne son évaluation, tout en prenant en considération les méthodes de Molitor, de Pick, et de Bijlsma qui déterminent l'action antidiurétique de l'hypophyse sur le chien non anesthesié et sur l'homme normal après ingestion d'eau ou sur l'homme atteint du diabète insipide.

Nous décrirons ci-dessous les trois sortes de méthodes qui permettent d'apprécier les activités ocytocique, hypertensive et antidiurétique de l'hypophyse.

I. *Dosage de l'activité ocytocique d'un extrait d'hypophyse.*

L'activité ocytocique d'un extrait de lobe postérieur d'hypophyse peut être déterminée suivant la technique décrite dans la pharmacopée des Etats-Unis U. S. P. X. en comparant son action stimulante sur l'utérus de cobaye vierge, à la même action obtenue avec une poudre étalon.

Les préparations hypophysaires de provenance diverses présentent entre elles de telles différences d'activité que d'après les dosages effectués dans les divers pays par Smith et Mc. Closky [3], Roth [4] aux Etats-Unis, Dale et Burn [5] en Angleterre, Trendelenburg [6] en Allemagne, Heymans [7] en Belgique, Tiffeneau [8] en France, les préparations d'hypophyse les plus actives peuvent posséder un pouvoir ocytocique quatre cents fois plus fort que la préparation la moins active. Ces constatations montrent la nécessité de standardiser les préparations d'hypophyse.

Unité internationale et étalon d'hypophyse.

La conférence internationale de Francfort tout en laissant à chaque pharmacopée le soin de fixer le titre officiel qui lui paraît s'adapter le mieux à la pratique médicale[1] recommande d'exprimer l'activité des préparations d'hypophyse par rapport à l'étalon international, non plus en fraction de lobe postérieur frais, mais en unités internationales d'activité ocytocique ; l'unité

1. D'après la pharmacopée des États-Unis une solution injectable d'hypophyse contenant les principes solubles dans l'eau du lobe postérieur frais de l'hypophyse du bœuf doit avoir une activité telle que 1 centimètre cube possède sur l'utérus isolé de cobaye vierge une activité qui ne soit pas inférieure, ni supérieure de plus de 20 pour 100 à celle que possède une solution de 5 milligrammes de poudre d'hypophyse étalon. Le soluté officinal de la dernière Pharmacopée des États-Unis ainsi préparé contient donc 10 unités internationales par centimètre cube.

ocytocique exprimant l'activité de $0^{mg},5$ de poudre étalon préparée dans des conditions bien définies.

L'étalon international d'hypophyse mis à la disposition des différents pays a été préparé par le Pr Voegtlin. Il est constitué par de la poudre de lobe postérieur d'hypophyse de bœuf desséchée et épuisée par l'acétone, à deux reprises. Cette poudre doit être conservée à l'obscurité et à basse température dans des ampoules scellées dans le vide.

Chaque nation devra contrôler son étalon national avec l'étalon international.

Préparation d'un soluté aqueux de l'étalon pour l'essai biologique. Technique de la Pharmacopée des Etats-Unis, U. S. P. X. Une quantité convenable de poudre d'hypophyse étalon préalablement séchée[1] est pesée et introduite dans un petit mortier en agate ; on y ajoute quelques gouttes d'eau distillée contenant 0,25 pour 100 d'acide acétique. On triture jusqu'à obtention d'une consistance homogène. On ajoute quelques centimètres cubes de la solution acide à 0,25 pour 100 et on agite vigoureusement le mélange. Le tout est introduit dans un tube à essai ou dans une fiole de verre gradué. On rince le mortier avec la solution acide puis finalement on ajoute une certaine quantité de la même solution acétique de telle sorte que chaque centimètre cube du volume final du mélange contienne 1 milligramme de poudre étalon. On chauffe ce mélange jusqu'à ébullition, on maintient l'ébullition une minute, puis on filtre. Chaque centimètre cube du filtrat représente l'activité d'un milligramme de poudre étalon.

On introduit cette solution dans des ampoules de verre et on la stérilise par tyndallisation, c'est-à-dire en la chauffant trois jours de suite, durant vingt minutes, à une température ne dépassant pas 100°. On maintient cette solution étalon entre

1. Il est essentiel d'opérer sur une poudre préalablement séchée et de la peser rapidement. Gaddum [9] a montré en effet que la poudre d'hypophyse s'hydrate rapidement, d'environ 10 pour 100 en deux minutes.

15° et 20°. On ne doit pas la conserver plus de six mois. Cette solution contient par centimètre cube deux unités internationales.

On prépare, à partir de la poudre d'hypophyse dont on veut déterminer l'activité, une solution identique à celle-ci.

Description de l'appareil utilisé pour la détermination de

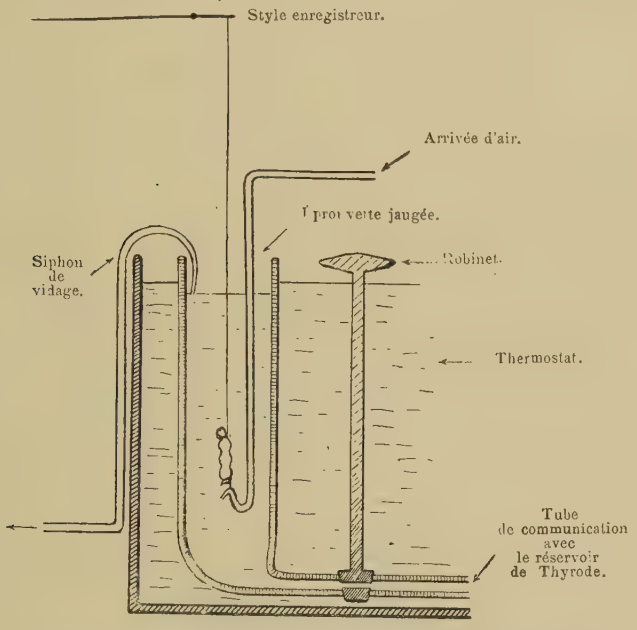

Fig. 3. — Section de l'appareil utilisé pour le dosage des préparations de lobe postérieur d'hypophyse au moyen de l'utérus de cobaye vierge.

l'activité ocytocique d'une solution d'hypophyse. — L'appareil que nous décrivons (fig. 3) est celui que nous avons utilisé journellement au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de médecine de Paris pour l'étude de l'action des substances médicamenteuses sur les muscles isolés de mammifères et pour les dosages de poudre d'hypophyse[1].

1. Cet appareil est construit sur le principe de l'appareil décrit par Penau et Simonnet [10].

Il se compose essentiellement d'un thermostat chauffé au gaz et muni d'un régulateur dans lequel plongent deux éprouvettes jaugées dont la capacité est de 75 ou de 90 centimètres cubes [1]. Celles-ci sont remplies d'une solution de Tyrode et destinées à recevoir les organes isolés, en l'espèce les cornes utérines. Ces éprouvettes communiquent par des robinets situés à leur partie inférieure avec un réservoir de liquide de Tyrode placé également dans le thermostat et maintenu à température constante. A la partie supérieure de chaque éprouvette, au niveau du trait de jauge, affleure un siphon. Ce dispositif permet de renouveler complètement le liquide après une expérience et de laver l'éprouvette avec 4 à 5 fois son volume de Tyrode s'écoulant de bas en haut d'une façon uniforme.

Un tube de verre creux, effilé et recourbé en crochet pénétrant dans l'éprouvette laisse passer bulle à bulle un courant d'air qui oxygène le liquide. L'organe dont on étudie les mouvements est fixé par son extrémité inférieure à ce tube et la résultante de ses mouvements est transmise par un fil de soie à un levier très léger que l'on équilibre au moyen d'un petit poids. Les mouvements sont ainsi amplifiés 4 à 5 fois environ et enregistrés verticalement sur un papier enduit de noir de fumée fixé sur un cylindre enregistreur (modèle Boulitte) tournant à une vitesse telle que 50 centimètres de papier se déplacent en 90 minutes. La température du thermostat est maintenue à 38° à l'aide d'un régulateur à gaz et ne varie pas de 1/10 de degré pendant toute la durée d'une expérience. On contrôle à chaque instant la température du bain à l'aide d'un thermomètre qui y est fixé à demeure.

La préparation du Tyrode doit être effectuée avec le plus grand soin : l'eau est fraîchement distillée dans des appareils de

1. Bien que les commissions internationales recommandent l'emploi d'éprouvettes contenant au moins 100 centimètres cubes nous avons toujours utilisé des éprouvettes jaugeant 75 à 90 centimètres cubes qui nécessitent pour leur lavage un volume moindre de Tyrode ce qui rend les manipulations plus faciles.

verre, la pureté des sels employés est vérifiée ; le sel de calcium utilisé est pesé avec précision. La solution de Tyrode est préparée extemporanément comme suit. A 940 centimètres cubes d'eau distillée on ajoute 0g,5 de glucose ainsi que 50 centimètres cubes de la solution 1 et 10 centimètres cubes de la solution 2.

Solution 1.

Chlorure de sodium pur.	180 g.
Chlorure de potassium pur.	8g,4.
Chlorure de calcium granulé pur. . . .	2g,4.
Chlorure de magnésium.	0g,10.
Eau distillée q. s. pour.	1000 cm3.

Solution 2.

Bicarbonate de soude[1].	0g,5.
Eau distillée.	10 cm3.

Préparation de l'utérus de cobaye. — Les cobayes expérimentés pèsent de 175 grammes à 350 grammes ; ils ne doivent être ni dans l'état gravide ni à l'époque du rut. Il est recommandé que les jeunes cobayes femelles soient isolées dès qu'on peut les séparer de la mère et qu'elles soient conservées ensuite loin de la vue et de l'odeur des cobayes mâles.

L'animal est sacrifié soit par section du cou, soit par saignée. Il est alors étendu sur une planchette. On incise la peau sur la ligne médiane du pubis à l'appendice xyphoïde puis la paroi abdominale et on rabat la masse intestinale d'un côté de telle sorte que l'on découvre les cornes utérines. A partir de ce moment les manipulations doivent être exécutées rapidement et très délicatement[2]. On sépare l'une de l'autre les cornes utérines. On passe un fil sous l'utérus à 1 ou 2 millimètres du point de

1. Les solutions de bicarbonate de soude doivent être fraîchement préparées.

2. Nous avons toujours utilisé, à l'exemple de Smith et Mac Closky [3] et de Penau et Simonnet [10], la corne utérine seule alors que Burn et Dale emploient non seulement la corne mais aussi la trompe et l'ovaire.

confluence des deux cornes et au moyen d'un second nœud destiné à éviter le contact des organes avec le support (Penau et Simonnet [10]) on fixe cette extrémité au tube de verre creux amenant l'air. Un second fil est noué sous l'autre extrémité de la corne avant son abouchement à la trompe. Avant de le mettre en rapport avec le levier chargé de transmettre ses mouvements on libère l'utérus en dehors des ligatures. La deuxième corne utérine est prélevée de la même manière, placée dans la seconde éprouvette et adaptée au deuxième appareil enregistreur.

Technique du dosage. — Après 10 à 15 minutes, les cornes utérines placées dans la solution de Tyrode sont absolument relâchées et l'on peut commencer l'expérience. On introduit dans le bain une quantité de soluté d'hypophyse étalon suffisante pour obtenir une contraction du muscle utérin ; on recommence de 10 en 10 minutes l'expérience, avec la même dose d'hypophyse jusqu'à ce que l'on obtienne une réponse régulière. Entre chaque essai on lave soigneusement l'éprouvette. Il est nécessaire d'employer une dose d'hypophyse suffisamment forte pour obtenir une contraction utérine qui, sur le tracé, se traduise par une ascension importante et rapide suivie d'une chute non interrompue par des contractions successives. D'autre part, il ne faut pas employer une dose fournissant la contraction maximum qui fatiguerait rapidement le muscle. Si, par surprise, on utilise au début de l'expérience une dose trop forte il faut rapidement laver les cornes utérines et employer ensuite des doses plus faibles.

Quand on a déterminé la dose du soluté d'hypophyse étalon qui provoque un effet suffisant et régulier (environ 2/3 de la contraction maximum) on recommence l'expérience de façon identique avec l'hypophyse de titre inconnu, en cherchant à obtenir des contractions de même amplitude que celles qui ont été fournies par la poudre étalon. On répète cet essai un certain nombre de fois en utilisant successivement la poudre d'activité

inconnue et l'étalon. Comme l'activité de chaque préparation est inversement proportionnelle à la quantité d'hypophyse nécessaire pour produire les mêmes effets il est possible, par la comparaison des graphiques, d'évaluer l'activité d'une hypophyse par rapport à celle de l'étalon.

Avec l'appareil décrit ci-dessus, il nous a été possible d'opérer deux dosages simultanés chacun avec une des cornes utérines. Lorsque l'utérus de cobaye n'a pas de mouvements spontanés et qu'il est en état de fournir un dosage précis, on peut opérer sur les mêmes cornes utérines pendant trois ou quatre heures. Entre chaque essai, qui dure trois ou quatre minutes, on opère le lavage de l'éprouvette et on attend dix minutes de telle sorte que chaque dose peut être ajoutée toutes les quinze minutes.

Exemple. — Dosage d'une poudre d'hypophyse « S » par rapport à l'étalon international.

On prépare avec la poudre d'hypophyse S et avec la poudre étalon EI deux solutés aqueux suivant la technique de la pharmacopée des États-Unis U. S. P. X. Chaque centimètre cube du filtrat représente l'activité contenue dans 1 milligramme de poudre d'hypophyse. On peut utiliser quelques centièmes de centimètre cube de cette solution mesurée avec une micro-pipette.

Le cobaye utilisé, sur lequel on prélève, comme il a été dit ci-dessus, les deux cornes utérines, pèse 250 grammes. Les éprouvettes jaugées dans lesquelles sont introduites les deux cornes utérines ont une contenance de 90 centimètres cubes.

1re expérience. — Après nous être assuré à cinq reprises différentes, que $0^{cm3},5$ de soluté à 1×10^{-5} préparé à partir de la poudre étalon fournit chaque fois sur la première corne utérine une contraction sensiblement de même amplitude, nous avons fait agir plusieurs fois de suite $0^{cm3},5$ du soluté 1×10^{-5} préparé à partir de la poudre S. Les résultats obtenus, qui sont visibles sur la figure 4, indiquent que la poudre S est moins active que la poudre étalon.

2e expérience. — Après nous être assuré quatre fois de suite

que 1 centimètre cube du soluté à 1×10^{-5} préparé avec la poudre S produit sur la deuxième corne utérine une contraction d'intensité constante, nous avons fait agir successivement $0^{cm3},8$ du soluté 1×10^{-5} préparé avec la poudre étalon et 1 centimètre cube du soluté 1×10^{-5} préparé avec la poudre S. Le tracé représenté ci contre (fig. 5) montre que 1 centimètre

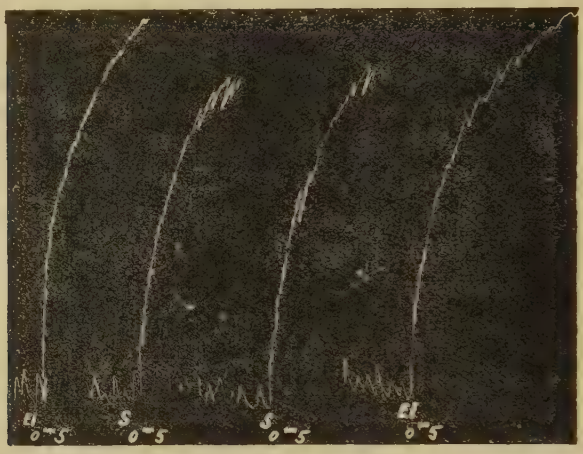

FIG. 4 (réduite de 1/2). — Action sur une corne utérine de cobaye de deux solutés d'hypophyse à 1×10^{-5} préparés l'un à partir de la poudre S et l'autre à partir de l'étalon international EI.

cube du soluté à 1×10^{-5} préparé avec la poudre S a la même action que $0^{cm3},8$ du soluté à 1×10^{-5} préparé avec la poudre étalon. On peut, d'après ces résultats, exprimer l'activité de la poudre S par rapport à celle de l'étalon international.

Rapport des activités des deux poudres :

$$\frac{0,8 \times 10^{-5}}{1 \times 10^{-5}} = 0.8.$$

La poudre S titre donc 80 pour 100 de l'étalon international.

En exprimant le même résultat sous une autre forme, c'est-à-dire, en prenant pour unité de mesure, selon les recommandations des commissions internationales, l'unité ocytocique on

peut dire que 10 milligrammes de la poudre S qui équivalent à 8 milligrammes de poudre étalon ont une activité de 16 unités internationales.

Nous avons réuni dans le tableau VII les expériences exposées ci-dessus ainsi que celles qui ont été obtenues sur deux autres

Fig. 5 (réduite de 1/2). — Action sur la deuxième corne utérine de cobaye de deux solutés d'hypophyse à 1×10^{-5} préparés à partir de la poudre S et de l'étalon international E!.

cornes utérines. La valeur moyenne de la poudre S est obtenue en faisant la moyenne de tous les essais effectués.

Tableau VII.

NUMÉRO D'ORDRE DES ESSAIS	POIDS DU COBAYE	ACTIVITÉ DE 10 MG. DE LA POUDRE D'HYPOPHYSE S (en unités internationales)
1	230	< 20
2	230	16
3	250	20
4	250	14
		Moyenne. . . 16,0

10 milligrammes de poudre S ont une activité représentée par 16,6 unités ocytociques.

Calcul des erreurs. — On peut évaluer les erreurs commises dans un tel dosage soit en calculant l'écart individuel moyen (voir première partie) soit en s'inspirant comme l'a fait Sawasaki [11] des travaux de Lind Van Wijngaarden sur les dosages de digitale et en calculant l'écart moyen pour cent ; Sawasaki admet que dans un dosage d'hypophyse on peut se contenter d'un nombre « n » d'essai si l'écart moyen est inférieur à $a\sqrt{n-1}$, a étant pris égal à 6,67 par analogie avec les travaux effectués sur les préparations digitaliques,

De plus quand on calcule la valeur moyenne d'une poudre d'hypophyse, il s'agit de savoir si l'on doit rejeter certains dosages dont les résultats sont nettement différents des autres. Bien que Sawasaki conseille de rejeter les nombres dont les écarts sont supérieurs à la limite des écarts admissibles (limite obtenue par le calcul) il ne nous semble pas qu'on doive écarter des moyennes les chiffres aberrants.

Dosage de l'histamine contenue dans les préparations d'hypophyse. — On peut déceler la présence de l'histamine contenue dans les préparations de lobe postérieur d'hypophyse au moyen de deux procédés différents. Quelle que soit la technique utilisée, une poudre d'hypophyse d'une activité égale à 10 unités internationales ne doit pas contenir plus de $0^{mg},1$ d'histamine.

Essai sur l'utérus de cobaye. — On ajoute à la solution d'hypophyse conformément aux prescriptions du P^r^ Dale un volume d'une solution de soude normale et on abandonne un tel mélange à la température de la chambre pendant 1 heure. On neutralise exactement [1] la soude avec une solution double

1. Il est nécessaire de neutraliser parfaitement les solutions employées, car des expériences récentes effectuées simultanément par nous-mêmes au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de médecine de Paris et par R. Vaucomont (*Archiv. intern. de Pharm. et de Thér.*, t. 36, 1929, p. 285) ont montré que l'activité contractile des anses intestinales est avant tout fonction de l'alcalinité du liquide que les baigne.

normale d'acide chlorhydrique. La présence de la solution alcaline détruit totalement le principe actif de l'hypophyse de telle sorte que si la solution ainsi traitée agit sur l'utérus de cobaye c'est qu'elle contient de l'histamine. Il est possible de doser l'histamine contenue dans l'extrait hypophysaïre en comparant l'effet ainsi obtenu à celui que fournit une solution titrée d'histamine.

Essai sur l'intestin de cobaye. — On fait agir l'extrait aqueux d'hypophyse sur l'intestin isolé de cobaye comparativement à une solution d'histamine ; le principe actif de l'hypophyse n'agissant pas sur l'intestin de cobaye, seule l'action de l'histamine se manifeste.

II. *Dosage de l'activité hypertensive d'un extrait d'hypophyse.*

L'activité hypertensive d'un extrait d'hypophyse est déterminée en comparant l'élévation de pression artérielle que provoque une injection intraveineuse de cet extrait chez un chat décapité ou un chien anesthésié à celle que fournit une poudre étalon.

Cette méthode présente de nombreuses difficultés car, d'une part, les résultats sont différents selon que l'on utilise le chat décapité ou le chien anesthésié, et d'autre part, des injections successives répétées de préparations d'hypophyse ne produisent jamais une hypertension comparable à elle-même, la hausse de pression diminuant sensiblement à chaque nouvelle injection. Cette variabilité d'action est sans doute due à la plus ou moins grande quantité de produits de dégradation des protéines contenues dans les préparations d'hypophyse.

Hogben, Schlapp et Mac Donald [12] ont cependant montré que si on utilise le chat décapité suivant la technique de Dale, en effectuant une fois par heure l'injection d'extrait d'hypophyse,

il n'y a pas de diminution sensible de l'hypertension et que l'on peut utiliser cette technique pour comparer entre eux deux extraits d'hypophyse. Nous insisterons uniquement sur cette méthode qui semble la plus précise, bien que d'une technique difficile, et qui, de plus, ne peut être employée que pour une poudre d'hypophyse ne renfermant que peu ou pas d'histamine.

Technique de Dale. — Un chat mâle de trois ou quatre kilogrammes est anesthésié au chloroforme. Il est décérébré et sa moelle épinière est détruite (Voir chapitre II). On le laisse au repos environ une heure en le protégeant contre tout refroidissement. La pression carotidienne est inscrite sur un cylindre enregistreur et on fait les injections dans la veine fémorale ou la veine saphène. On injecte successivement un soluté d'hypophyse d'activité inconnue et un soluté d'étalon international et on compare directement sur le tracé les hauteurs des courbes successives. Les solutions injectées doivent avoir une activité d'environ 5 à 10 unités internationales ocytociques pour fournir une hausse suffisante de la pression artérielle.

III. *Dosage de l'activité antidiurétique des préparations d'hypophyse*[1].

L'action antidiurétique des préparations d'hypophyse peut être estimée soit en déterminant la diminution de l'urine sécrétée après injection d'extrait d'hypophyse, par un chien en état de diurèse, soit en évaluant le retard apporté à la sécrétion maximum après absorption d'une certaine quantité d'eau et injection de préparations hypophysaires chez le chien ou l'homme.

1. Les préparations de lobe postérieur d'hypophyse ont, suivant les conditions, un effet diurétique ou un effet antidiurétique. Ils manifestent leurs effets antidiurétiques en particulier chez l'homme atteint de diabète insipide, chez les animaux privés d'hypophyse ainsi que chez l'homme normal ou les animaux non anesthésiés en état de diurèse provoquée.

Méthode de Molitor et de Pick [13]. — On utilise des chiennes pesant de 8 à 10 kilogrammes auxquelles on fait une fistule vésicale permanente (Schwartz et Wiechowski) [14]. On peut utiliser ces animaux huit jours après l'opération. Cinq heures avant l'expérience on ne donne aux animaux ni eau, ni nourriture ; puis on leur introduit dans l'estomac au moyen d'une sonde stomacale 250 centimètres cubes d'eau et on injecte par voie sous-cutanée une certaine dose de la solution d'hypophyse de titre inconnu. On compare la quantité d'urine sécrétée dans les mêmes conditions par le même animal auquel on injecte une solution d'hypophyse étalon.

Unité antidiurétique d'hypophyse. — Kestranek, Molitor et Pick [15] ont proposé d'adopter comme unité antidiurétique l'activité d'une certaine quantité d'extrait d'hypophyse qui, rapportée au kilogramme d'animal, diminue la diurèse normale du chien de 80 pour 100 en deux heures. Pour obtenir une telle action il faut injecter $0^{mg},5$ d'étalon international. Ainsi l'unité internationale ocytocique et l'unité antidiurétique représentent toutes deux l'activité de $0^{mg},5$ de poudre d'hypophyse étalon.

Méthode de Bijlsma [16]. — Cette méthode est basée sur le fait que lorsqu'on fait absorber à un chien une certaine quantité d'eau, 800 à 1 000 centimètres cubes, l'excrétion maximum d'urine a lieu 2 heures après l'absorption d'eau ; si on injecte à l'animal par voie sous-cutanée une certaine quantité de préparations d'hypophyse l'excrétion maximum est retardée. Ce retard est d'autant plus considérable que la dose d'hypophyse est plus grande. De plus, on a pu montrer que le retard apporté à l'excrétion maximum d'eau est proportionnelle à la force de l'extrait.

Cette méthode a été étendue à l'homme (Burn) [17]. Le sujet vide régulièrement sa vessie toutes les quinze minutes pendant une heure à une heure et demie, jusqu'à ce que la sécrétion urinaire soit de 8 à 18 centimètres cubes par 15 minutes. On fait alors au sujet une injection sous-cutanée d'une préparation hypophysaire. Il faut, en général, injecter $0^{cm^3},1$ à $0^{cm^3},2$ d'une

solution contenant par centimètre cube une quantité d'hypophyse correspondant à une unité internationale. Le sujet doit boire au même moment un litre d'eau de source maintenu à 25°. On recueille les urines toutes les quinze minutes et on note leur volume. L'excrétion maximum d'urine qui, normalement, en l'absence de toute injection d'hypophyse, a lieu 1 heure 1/4 après l'absorption d'eau, se produit pour une injection de 0,1 unité internationale d'hypophyse après deux heures quarante-cinq minutes environ.

On répète l'expérience avec une solution d'hypophyse d'activité inconnue. Il est possible, en comparant les résultats, d'exprimer l'activité antidiurétique d'une poudre d'hypophyse en fonction de celle de l'hypophyse étalon.

BIBLIOGRAPHIE

[1] H. H. Dale et P. P. Laidlaw, *Journ. Pharm. exp. Thérap. 4,* 1912, 75.
[2] H. H. Dale, J. H. Burn, *Med. Res. Counc. 69,* 1922, 5.
[3] M. I. Smith et W. M. T. Mc Closky, *Public Health. Serv. hygien. Lab.* Bulletin *168,* 1924, 9.
[4] G. B. Roth, *Public Health. Serv. hygien. Lab.* Bulletin *109,* 1916, 1.
[5] H. H. Dale et J. H. Burn, *Medical Res. Counc., loc. cit.*
[6] P. Trendelenburg et E. Borgmann, *Bioch. Zeitsch. 106,* 1920, 239.
[7] C. Heymans, *Archiv. intern. de Pharm. et de Ther. 30,* 1925, 275.
[8] M. Tiffeneau, *Bul. Soc. de Thér. 33,* 1927, 134.
[9] J. H. Gaddum, *Pharm. Journ. 119,* 1927, 580.
[10] H. Penau et H. Simonnet, *Journ. Pharm. et chim. 2,* 1925, 513 ; H. Penau, H. Simonnet et L. Blanchard, *L'Hypophyse.* Les Presses universitaires de France, 1929.
[11] H. Sawasaki, *Pflügers Archiv. 209,* 1925, 137.
[12] Hogden, W. Schlapp et A. Mac Donald, *Quart. Journ. exp. Phys. 14,* 1924, 301.
[13] H. Molitor and E. P. Pick, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 101,* 1923, 169; *112,* 1926, 113.
[14] Schwartz et Wiechowski, *Zentralb. f. phys. 28,* 1914, 439.
[15] W. Kestranek, H. Molitor et E. P. Pick, *Bioch. Zeistchr. 164,* 1925. 34.
[16] G. Bijlsma, *Klin. Wochen. 4,* 1915. 2421.
[17] J. H. Burn, *Methods of biological Assay.* Oxford University Press, 1928.

CHAPITRE IV

ERGOT DE SEIGLE

Les substances actives chimiquement définies extraites de l'ergot de seigle peuvent être divisées en deux groupes. Celui des alcaloïdes qui comprend l'ergotoxine, l'ergotinine, l'ergotamine, l'ergotaminine et celui des bases aminées parmi lesquelles les plus importantes sont la tyramine, l'histamine, l'isoamylamine et l'acétylcholine. Tandis que les alcaloïdes de l'ergot ont une activité physiologique considérable et peuvent être utilisés comme excitants utérins[1] et aussi comme vasoconstricteurs, les bases aminées qui sont contenues dans les préparations d'ergot n'ont qu'une faible action spécifique aux doses thérapeutiques (Bourne et Burn [1]) ; tout au plus, l'action de la tyramine et de l'histamine peut elle être considérée comme synergique de celle des alcaloïdes.

Les préparations galéniques de l'ergot contenant, suivant leur fabrication et leur conservation, des quantités très variables de substances actives, il fallut envisager leur dosage qui a fait l'objet de nombreuses et minutieuses recherches. Les quelques méthodes chimiques proposées n'ont pas donné satisfaction aux pharmacologistes ; quant aux méthodes biologiques, elles sont basées sur les différentes propriétés physiologiques de l'ergot de

1. Les alcaloïdes de l'ergot peuvent eux-mêmes être divisés en deux groupes, l'un constitué par l'ergotamine et l'ergotoxine très actives, l'autre par l'ergotinine et l'ergotaminine moins actives.

seigle, à savoir son action sur l'utérus isolé ou in situ, son action nécrotique sur la crête du coq, son effet sur la pression artérielle.

Après examen des différents rapports qui ont été présentés sur ces méthodes diverses, les conférences internationales réunies par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations ont recommandé pour la standardisation de l'ergot et de ses préparations galéniques les méthodes définissant leur teneur en alcaloïdes spécifiques et elles ont notamment préconisé comme pratique et exacte la méthode de Broom et Clark [2].

Etalon d'ergot de seigle.

Il n'existe pas d'étalon international. On peut utiliser comme étalon soit le phosphate d'ergotoxine cristallisé soit le tartrate d'ergotamine chimiquement pur en tenant compte de leur teneur respective en alcaloïde[1].

On utilise une solution préparée en pesant une quantité définie d'étalon préalablement séché dans le vide, et en le dissolvant dans l'eau de façon à obtenir une solution à 1 100 que l'on dilue ultérieurement.

Méthode utilisant l'utérus isolé de lapine.

Technique de Broom et Clark [2], *Burn et Ellis* [3]. Cette technique est basée sur l'action des alcaloïdes de l'ergot sur le système nerveux sympathique qu'ils paralysent de telle sorte que l'action ultérieure de l'adrénaline sur l'utérus isolé de lapine est fortement diminuée.

1. La Pharmacopée des États-Unis a adopté comme étalon le phosphate d'ergotoxine.

Description de l'appareil. — On utilise l'appareil employé pour le dosage de l'hypophyse et décrit dans le chapitre III. La solution de Tyrode qui est utilisée est la même que celle qui sert au dosage de l'hypophyse mais on peut éviter d'y adjoindre du chlorure de magnésium.

Préparation de l'utérus. — On utilise des lapines de 2 kilogrammes non gravides. L'animal est tué soit par décapitation, soit par saignée. Dans l'un et dans l'autre cas il faut que le sang s'écoule abondamment. On ouvre ensuite l'abdomen pour libérer l'utérus. Celui-ci est placé entre deux morceaux de coton imbibés de liquide de Tyrode et peut être conservé dans la glacière pendant 10 jours. On prélève sur l'utérus des morceaux d'environ 1 centimètre que l'on place sur une surface convexe de façon à pouvoir séparer chacun d'eux par section longitudinale en deux morceaux de 3 à 4 millimètres de large. Chaque morceau est placé dans chacune des deux éprouvettes contenues dans le thermostat.

On équilibre les leviers pour que les deux morceaux d'utérus se relâchent d'une façon identique, A chaque bain on ajoute $0^{mg},02$ d'adrénaline qui produisent une contraction du muscle utérin qui persiste deux ou trois minutes. On remplace alors le liquide du bain qui contient l'adrénaline par du liquide de Tyrode. Si les contractions des deux morceaux d'utérus ont la même amplitude on peut continuer l'expérimentation, sinon il est nécessaire d'équilibrer de nouveau les deux leviers pour qu'une contraction de même amplitude se produise sur les deux fragments utérins.

Suivant la sensibilité du muscle il peut être nécessaire de diminuer ou d'augmenter la dose d'adrénaline. Il faut, le plus souvent, répéter le même essai 3 à 4 fois pour obtenir un effet constant.

Lorsque cet effet est atteint simultanément avec les deux fragments d'utérus, on ajoute, au même moment, dans une des éprouvettes du phosphate d'ergotamine par exemple et dans

l'autre, la solution à examiner. Suivant la sensibilité du muscle, il peut être nécessaire d'utiliser des solutions d'ergotamine de 1/10 000 à 1/100 000 qu'on laisse agir pendant 10 minutes[1]; puis, sans opérer le lavage des éprouvettes, on ajoute la même dose d'adrénaline que celle qui a été utilisée antérieurement. L'action stimulante est toujours moins importante que la précédente s'il a été utilisé une quantité suffisante d'alcaloïde spécifique.

Si les concentrations d'alcaloïde spécifique introduites dans les deux éprouvettes sont les mêmes et si elles agissent pendant le même temps, la diminution de hauteur de la contraction produite par l'adrénaline est identique pour les deux fragments d'utérus. On peut en déduire que si, inversement, la contraction de l'adrénaline est moins importante dans un bain que dans l'autre, c'est qu'il a été ajouté plus d'alcaloïde spécifique dans ce bain.

Les expériences sont recommencées jusqu'à ce que l'on puisse obtenir, en variant les dilutions de la préparation d'ergot de titre inconnu, des réductions de l'amplitude de la contraction adrénalinique qui soient égales ou très voisines des réductions d'amplitude des concentrations adrénaliniques obtenues avec l'étalon. On peut alors, en comparant les tracés, après les avoir fixés au vernis, estimer l'activité des préparations d'ergot en fonction de l'étalon choisi.

D'après Broom et Clark, cette méthode permet une évaluation de l'activité d'une préparation d'ergot avec une erreur qui peut atteindre 30 pour 100.

Exemple. — Dosage d'une solution de tartrate d'ergotamine.

1. Braux [4] a montré que l'effet de l'action spécifique de l'alcaloïde ne dépend pas seulement de sa concentration mais aussi du temps pendant lequel il agit, c'est pourquoi il est nécessaire dans une série de dosages de laisser agir les alcaloïdes spécifiques pendant un temps arbitraire mais constant.

On prépare une solution de chlorhydrate d'adrénaline à 1/50 000 ainsi qu'une solution étalon de tartrate d'ergotamine à 1/10 000 à laquelle on compare une solution de tartrate d'ergotamine d'activité inconnue, solution que l'on a primitivement diluée au 1/10.

On ajoute à diverses reprises, dans chacune des deux éprouvettes $0^{mg},004$ d'adrénaline et l'on constate que l'on obtient le même effet d'excitation avec les deux fragments utérins. On pratique un lavage des deux fragments d'utérus puis on ajoute dans une éprouvette $0^{mg},2$ de tartrate d'ergotamine E et dans l'autre $0^{cm3},3$ de la solution à titrer X et on attend 10 minutes. On ajoute alors à chacun des deux bains $0^{mg},004$ d'adrénaline (Voir fig. 6).

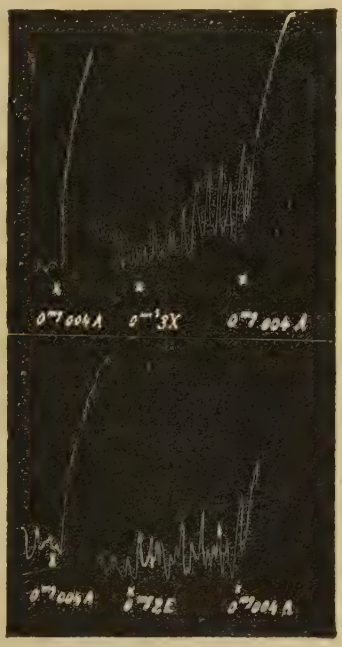

Fig. 6 (réduite de 1/2). — Dosage d'une solution de tartrate d'ergotamine (X) par rapport à une solution de tartrate d'ergotamine étalon (E) sur un fragment de corne utérine de lapine vierge.

Sur le tracé supérieur se succèdent l'action de $0^{mg},004$ d'adrénaline, de $0^{cm3},3$ de la solution à titrer, de $0^{mg},004$ d'adrénaline ; sur le tracé inférieur on voit les actions succcessives de $0^{mg},004$ d'adrénaline, de $0^{mg},2$ d'ergotamine étalon, de $0^{mg},004$ d'adrénaline.

Sur de nouveaux fragments d'utérus, on répète cette expérience en opérant avec des doses différentes (voir fig. 7 et 8).

Les tracés représentés dans les figures 6, 7 et 8 permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° La quantité de tartrate d'ergotamine contenue dans $0^{cm3},3$ de solution de titre X est plus petite que $0^{mg},2$ de tartrate d'ergotamine.

2° La quantité de tartrate d'ergotamine contenue dans $1^{cm3},3$

de solution de titre X est plus grande que $0^{mg},3$ de tartrate d'ergotamine.

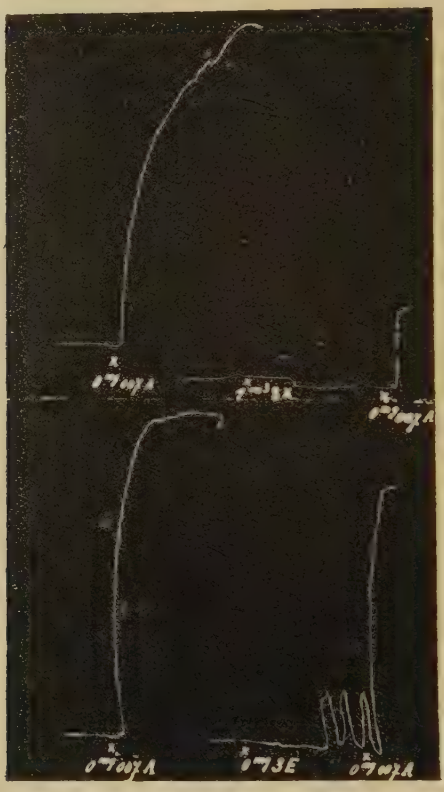

Fig. 7 (réduite de 1/2). — Dosage d'une solution de tartrate d'ergotamine (*suite*).

Sur le tracé supérieur se succèdent les actions de $0^{mg},007$ d'adrénaline, de $1^{cm3},3$ de substance à titrer, de $0^{mg},007$ d'adrénaline ; sur le tracé inférieur on voit les actions successives de $0^{mg},007$ d'adrénaline, de $0^{mg},3$ d'ergotamine étalon, de $0^{mg},007$ d'adrénaline.

3° La quantité de tartrate d'ergotamine contenue dans $0^{cm3},3$ est à peu près égale à $0^{mg},1$ de tartrate d'ergotamine.

On peut conclure de ces essais que $0^{cm3},3$ de la solution de titre X contient $0^{mg},1$ de tartrate d'ergotamine. Il s'ensuit que la solution mère contient $0^{mg},33$ de tartrate d'ergotamine par centimètre

cube ; c'est donc une solution de tartrate d'ergotamine à 1/3 000.

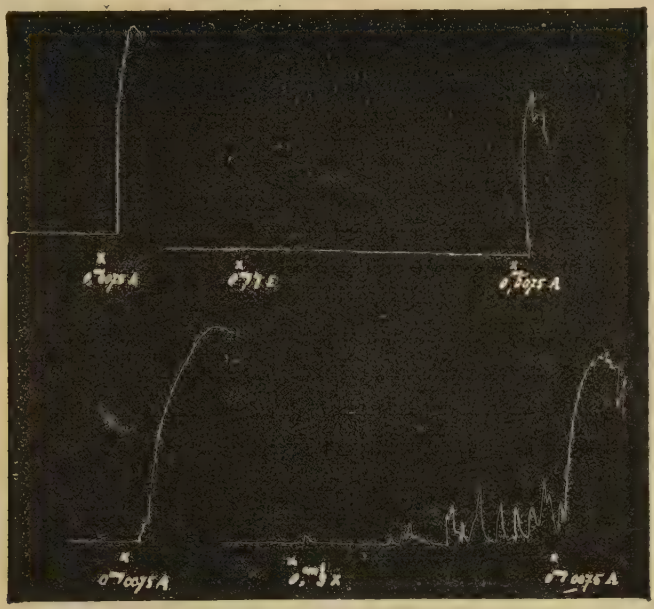

Fig. 8 (réduite de 1/2). — Dosage d'une solution de tartrate d'ergotamine (*suite*).

Sur le tracé supérieur se succèdent les actions de $0^{mg},0075$ d'adrénaline, de $0^{mg},1$ d'ergotamine étalon, de $0^{mg},0075$ d'adrénaline ; sur le tracé inférieur on voit les actions successives de $0^{mg},0075$ d'adrénaline, de $0^{cm3},3$ de solution à titrer et de $0^{mg},0075$ d'adrénaline.

Ces résultats ont été vérifiés par quelques autres expériences effectuées sur l'utérus d'un second lapin [1].

Autres méthodes utilisées pour le dosage des préparations d'ergot.

D'autres méthodes, énumérées ci-dessous, mais que nous n'exposerons pas en détail, ont été proposées pour le dosage des alcaloïdes de l'ergot.

1. On ne peut pas utiliser un même fragment d'utérus pour plus de trois dosages car sa sensibilité décroît assez rapidement.

a) ***Essai sur le coq.*** — Cette méthode (Edmunds et Hale [7]) consiste à déterminer la dose minimum d'ergot qui, en injection intramusculaire, provoque le même degré de nécrose de la crête de coq que celui qui est produit par la dose minimum d'étalon injectée d'une façon identique. Cette méthode qui est officielle aux États-Unis nécessite un grand nombre d'animaux et ne semble pas titrer seulement les alcaloïdes de l'ergot mais également les bases aminées.

L'effet obtenu sur la crête de coq est variable suivant la dose d'extrait d'ergot injectée ; tandis qu'avec les petites doses, on observe seulement de la pâleur, les doses fortes fournissent des phénomènes nécrotiques. Edmunds et Hale utilisent pour leur dosage deux coqs de même race, de même âge, de même poids dont l'un reçoit 5 milligrammes d'ergotoxine et l'autre une certaine dose de la préparation à examiner. Les injections sont répétées tous les trois jours et l'on fait varier les doses utilisées jusqu'à ce que les résultats observéss ur les deux crêtes soient identiques. L'essai est répété sur un certain nombre de paires de coqs.

b) ***Détermination de la pression artérielle.*** — Cette méthode mise au point par Paul Pittenger et E. Vanderkleed [6]) est basée sur l'augmentation de la pression artérielle provoquée par une injection intraveineuse d'ergot.

Une autre méthode recommandée par Barger et Dale [7] est basée sur l'action différente de l'adrénaline sur la pression sanguine avant et après injection d'ergot.

c) ***Essai sur l'intestin de cobaye ou de lapin.*** — Planeles [8] puis Issekutz et Leinzinger [9] déterminent la dose d'ergot qui diminue l'inhibition intestinale provoquée par l'adrénaline sur l'intestin isolé de cobaye ou de lapin ; puis ils comparent cette dose à une dose de l'étalon provoquant un effet analogue [1].

1. Nous avons expérimenté longuement cette méthode qui ne nous paraît pas suffisamment précise pour être utilisée comme méthode de dosage des extraits d'ergot.

Cette méthode qui permet, d'après ces auteurs, d'estimer à 30 pour 100 près, l'activité d'une solution d'un alcaloïde pur de l'ergot ne peut être utilisée pour les préparations d'ergot qui contiennent des substances agissant fortement sur l'intestin de cobaye et de lapin.

d) ***Détermination de l'action vasoconstrictrice de l'ergot.*** — Cette méthode consiste à chercher la plus petite dose d'ergot qui supprime l'action vasoconstrictrice de l'adrénaline sur une préparation de grenouille de Laewen-Trendelenburg. La sensibilité de cette méthode est moindre que celle de l'utérus isolé (Masuda [10], Edmonds et Hale [11]).

e) ***Essai sur l'utérus in situ de mammifère.*** — L'animal utilisé, le plus souvent un chat, est immergé dans un bain de sérum physiologique maintenu à la température constante de 39°. On incise la paroi abdominale de l'animal depuis le diaphragme jusqu'à la symphyse et on immerge totalement les intestins. On libère l'utérus puis on attache l'une des cornes utérines aux leviers d'un appareil enregistreur et on fait varier le contre-poids suivant la sensibilité de l'organe.

On fait une injection intraveineuse d'une certaine quantité de l'étalon et on enregistre les mouvements utérins qui en résultent. Puis on fait successivement des injections avec l'étalon et avec la préparation à examiner à des concentrations diverses.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Bourne et J. H. Burn, *Journ. Obstet. and gynaec. of the Brit. Emp. 34,* 1927, 249.
[2] Broom et Clark, *Journ. Pharm. exper. Therap. 22,* 1923, 59.
[3] J. H. Burn et W. Ellis, *Pharmac. Journ. 118,* 1927, 384.
[4] A. Braun, *Archiv. exp. Path. u. Pharm. 108,* 1925, 96.

[5] C. W. Edmunds et Hale, *Hyg. Lab. U. S.* Bulletin 76, Washington 1911.
[6] P. Pittenger et Chas. E. Vanderkleed, *Journ. Am. Phys.* 1914, 926.
[7] G. Barger et H. H. Dale, *Journ. Phys. 41,* 1910, 19.
[8] J. Planeles, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 105,* 1925, 38.
[9] B. v. Issekutz et Mv. Leinzinger, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 128,* 1928, 165.
[10] Masuda, *Bioch. Zeitsch. 163,* 1925, 37.
[11] C. W. Edmunds et Hale, Bul. 76, *Hyg. Lab. U. S.* Pub. Health et Mac Hosp. Serv. 28.

CHAPITRE V

ARSÉNOBENZÈNES

Les dérivés arsenicaux organiques actuellement employés en clinique comme médicaments spécifiques se divisent en deux groupes distincts ; les uns sont des arséno caractérisés par le groupement fonctionnel As = As, les autres des acides arsiniques ayant pour groupement fonctionnel $-As\begin{matrix}O\\(OH)^2\end{matrix}$. Tandis que ces derniers, généralement stables, peuvent être isolés à l'état de pureté et sont par conséquent contrôlables chimiquement, les arséno dont il existe divers types (arséno, novarséno, sulfarséno) sont au contraire relativement peu stables et ne peuvent être obtenus parfaitement purs ; leur contrôle chimique bien qu'utile est insuffisant et leur contrôle biologique s'impose.

Le contrôle des arséno nécessite donc une double série d'essais les uns chimiques, les autres biologiques. Ces deux sortes d'essais sont pratiqués en France conformément aux prescriptions du Codex (décret du 30 mars 1928) qui, pour ce qui concerne les essais biologiques, ont été en partie inspirées par les décisions prises par les diverses conférences internationales organisées par la Société des Nations [1]. Celles-ci ont proposé que les essais biologiques des médicaments arsenicaux du type arséno comportent non seulement un contrôle de leur toxicité sur des animaux normaux comme cela avait été admis dès l'origine, mais aussi, comme on en a reconnu plus tard la nécessité, un examen de leur efficacité curative sur des animaux expérimentalement infectés ; la

toxicité et l'activité thérapeutique n'étant pas absolument proportionnelles [2]. De plus, il fut recommandé d'effectuer les dosages des arsénobenzènes non pas en valeur absolue, mais comparativement à des étalons dont la préparation fut confiée à des Instituts spéciaux.

Les médicaments pour lesquels des étalons internationaux furent recommandés sont le dioxydiaminoarsénobenzène (syn. arsénobenzol, arsphénamine, salvarsan), ses dérivés métalliques et ses sels sodiques le dioxydiaminoarsénobenzène sulfoxylate de sodium (syn. néoarsphénamine, néosalvarsan, novarsénobenzol), son sel argentique et enfin le sulfarsénol ou sulfarsphénamine.

La préparation des étalons de l'arsénobenzol et du novarsénobenzol ainsi que de leurs dérivés métalliques fut confiée au Pr Kolle, celle du sulfarsénol étalon, au Pr Voegtlin.

Les produits servant à la préparation des étalons doivent être éprouvés au point de vue de leur stabilité à la chaleur, par chauffage à 60° durant plusieurs jours ; de plus, avant d'être introduits dans des ampoules de verre remplies d'un gaz inerte desséché, ils doivent être desséchés jusqu'à poids constant, dans le vide, sur de l'anhydride phosphorique. Les ampoules renfermant la poudre étalon sont scellées et conservées à une température ne dépassant pas 0°.

I. CONTROLE DE LA TOXICITÉ DES DIFFÉRENTES SUBSTANCES ARSENICALES DU TYPE ARSÉNO.

Nous envisagerons tour à tour les méthodes utilisées pour le contrôle de l'arsénobenzol, du salvarsan argentique, du novarsénobenzol, du sulfarsénol.

1° *Arsénobenzol.*

Le contrôle de la toxicité de l'arsénobenzol peut s'effectuer soit sur le lapin, soit sur la souris, soit sur le rat.

Les méthodes utilisées sont toutes basées sur le fait expérimental suivant : les doses injectées à un certain nombre d'animaux sont proportionnelles au pourcentage des décès obtenus [3]. C'est d'après ce principe et en tenant compte des statistiques et des erreurs commises dans les déterminations [1] que les différentes pharmacopées, et notamment la pharmacopée française ont institué leurs prescriptions au sujet du contrôle biologique des arsénobenzènes.

Nous décrirons ci-dessous les prescriptions des différentes pharmacopées.

Pharmacopée française (Décret du 30 mars 1928). — *a*) **Essai sur le lapin.** — On utilise des lapins mâles de préférence, abondamment nourris, exempts de toute maladie, pesant de $1^{kg},800$ à 2 kilogrammes conservés dans des clapiers propres et maintenus à température constante.

Préparation de la solution à utiliser. — La vaisselle et les pipettes utilisées dans cette préparation doivent être stérilisées. A 10 centimètres cubes d'eau stérilisée récemment distillée dans des appareils de verre, on ajoute 1 gramme d'arsénobenzol, puis peu à peu une solution de soude 5 fois normale jusqu'à ce que le précipité qui se forme préalablement soit complètement dissous ; pour que la dissolution soit complète, il faut utiliser environ $32^{cm^3},5$ de la solution alcaline. On ajoute ensuite à la solution alcaline la quantité d'eau distillée suffisante pour obtenir une solution d'arsénobenzol à 2 pour 100.

1. En ce qui concerne les erreurs commises dans ces dosages voir première partie, p. 16.

Injection à l'animal. — On injecte très lentement en 3 à 5 minutes dans la veine marginale du lapin, une solution à 1/100 d'arsénobenzol maintenue à 15 ou 20°, à raison de 0g,12 d'arsénobenzol par kilogramme de lapin [1]. L'essai est fait simultanément sur quatre lapins.

Pour qu'un produit soit acceptable, il faut que les quatre lapins injectés avec ce produit, dans les conditions ci-dessus décrites, soient vivants le septième jour après l'injection et qu'ils n'aient présenté ni émission d'un flux diarrhéique qui se prolongerait une demi-heure à une heure après l'injection. ni crise tonico-clonique caractérisée par une chute brusque sur le côté, suivi de mouvements de natation ou de rotation des membres. Si un seul des lapins présente des troubles digestifs l'essai doit être recommencé [2]. De plus, les échantillons déterminant un amaigrissement rapide ne doivent pas être mis en vente.

b) **Essai sur la souris.** — La valeur d'un échantillon d'arsénobenzol est déterminée en injectant différentes doses dans la veine de la queue d'un certain nombre de souris et en notant le pourcentage des décès obtenus. Les souris employées dans un essai doivent peser plus de 20 grammes et n'être utilisées qu'une heure après leur repas.

[De plus [3] les souris ne doivent pas être conservées dans le laboratoire où se trouvent les échantillons des médicaments arsenicaux, car les traces d'arsenic disséminées dans l'atmosphère

1. Si on utilise un lapin à jeun depuis 24 heures, il faut diminuer son poids de 100 grammes, qui représente approximativement le poids de la nourriture contenue dans l'estomac.

2. Bien que le Codex ne donne à cet égard aucune précision, il semble logique de conclure au rejet d'une substance lorsque dans chacun des deux essais consécutifs exécutés avec le même échantillon il y a un lapin qui présente des troubles digestifs. Autrement dit, si dans un essai effectué avec huit lapins un lapin a des troubles digestifs, le produit peut être accepté ; au contraire il est rejeté dans le cas où deux lapins manifestent quelques troubles digestifs.

3. Les recommandations que nous avons cru devoir ajouter et qui ne se trouvent pas dans le Codex, sont placées entre crochets.

suffisent pour donner lieu à de tels phénomènes d'accoutumance que les animaux présentent alors une résistance anormale aux doses toxiques.]

Préparation de la solution. — On pèse exactement $0^{g},2$ d'arsénobenzol que l'on broye dans un mortier avec $0^{cm^3},2$ d'alcool à 95°. On ajoute 4 centimètres cubes d'une solution de soude quintinormale, en agitant avec une baguette de verre pour dissoudre le précipité qui se forme primitivement. S'il reste des particules non dissoutes, on décante la solution dans une éprouvette graduée, et on dissout les particules restant dans le mortier par addition d'une ou deux gouttes de solution quintinormale de soude. On verse de nouveau le liquide dans l'éprouvette graduée, on rince le mortier avec une quantité d'eau distillée suffisante pour avoir un volume total de 60 centimètres cubes à la température de 30° : dans ces conditions on obtient une solution d'arsénobenzol à 1/300.

Injection à l'animal. — On injecte dans la veine de la queue de la souris 1/20 de centimètre cube par gramme d'animal de la solution hydroalcoolique d'arsénobenzol c'est-à-dire $0^{mg},16$ d'arsénobenzol par gramme d'animal.

[On peut, pour effectuer l'injection, placer l'animal dans une petite boîte de métal ou de carton dans laquelle il est maintenu immobile tandis que sa queue peut être facilement atteinte. L'injection doit être faite très lentement.]

On conserve les souris qui ont reçu l'arsénobenzol, dans des bocaux de verre garnis d'ouate et de graines alimentaires, à une température constante de 19 à 20°.

La pharmacopée française exige que cet essai soit pratiqué sur douze souris et que, sur les douze souris injectées à raison de $0^{mg},16$ d'arsénobenzol par gramme d'animal, la mortalité dans les trois jours qui suivent l'injection n'atteigne pas plus de quatre animaux.

Toutes ces déterminations de toxicité n'ont de valeur que si

les souris qui ont servi à un essai appartiennent à une souche dont la sensibilité a été éprouvée avec l'étalon.

Pharmacopée britannique. — Une dose correspondant à $0^{mg},1$ d'arsénobenzène par gramme d'animal est injectée à cinq souris, et une dose de 0^{mg}, 125 par gramme d'animal est injectée à cinq autres souris. Il faut pour qu'un produit soit acceptable que, dans chacun des lots, trois souris soient encore vivantes après quatre jours et que jusqu'au sixième jour aucun accident ou trouble n'ait été observé chez les animaux survivants, sinon l'essai doit être répété.

2° *Salvarsan argentique.*

Pour fixer la toxicité du salvarsan argentique on peut utiliser la souris (Burn [4]).

On injecte dans la veine de la queue, à cinq souris, $0^{mg},25$ par gramme d'animal au moyen d'une solution à 1/100 de sel d'argent du salvarsan et à cinq autres souris $0^{mg},15$ par gramme d'animal au moyen de la même solution. L'essai est complété comme pour le novarsénobenzol (voir ci-dessous).

3° *Novarsénobenzol.*

Pharmacopée française. — La pharmacopée française utilise comme animal d'expérience, soit le lapin, soit la souris. C'est en tenant compte des statistiques [5] que la commission du Codex a établi les conditions du contrôle du novarsénobenzol.

Essai sur le lapin. — L'essai est conduit comme avec l'arsénobenzol. Seule la préparation de la solution et les doses injectées diffèrent.

Préparation de la solution. — 1 gramme de novarsénobenzol est dissous dans 10 centimètres cubes d'eau récemment distillée dans du quartz.

Injection à l'animal. — On injecte dans la veine auriculaire de l'oreille en trois minutes, à une température de 18 à 20°, 0^{g},25 de substance par kilogramme d'animal et on injecte dans ces conditions quatre lapins.

Si le septième jour qui suit l'injection trois ou quatre animaux injectés ne survivent pas ou s'ils ont présenté, au moment de l'injection et dans les quatre heures qui suivent, des phénomènes diarrhéiques ou convulsifs, le produit ne doit pas être mis en vente.

Essai sur la souris. — On utilise des souris choisies suivant les conditions indiquées pour le contrôle de l'arsénobenzol.

Préparation de la solution. — On dissout 0^{g}, 75 de novarsénobenzol dans 100 centimètres cubes de solution stérilisée de chlorure de sodium à 0,6 pour 100. On prépare dans les mêmes conditions une solution à 0,85 pour 100,

Mode opératoire. — On injecte par voie intraveineuse dix souris de poids voisin de 20 grammes avec la solution à 0 75 pour 100 et dix autres souris avec la solution à 0,85 pour 100, à raison de 1/20 de centimètre cube de chacune des solutions par gramme de poids d'animal. Après les injections, les animaux sont conservés dans des bocaux garnis d'ouate et de graines alimentaires placés dans une pièce maintenue à température constante de 19 à 20°. Pour que la pureté d'un échantillon soit suffisante il faut que sept souris du premier lot et six souris du second survivent.

Pharmacopée britannique. — On injecte cinq souris à raison de 0^{mg},3 par gramme d'animal. Si une souris meurt dans les cinq jours qui suivent l'injection, le produit est acceptable. si deux souris meurent il faut effectuer un nouvel essai de la façon

suivante, on injecte à cinq nouvelles souris $0^{mg},4$ de novarsénobenzène par gramme d'animal. Si dans les cinq jours qui suivent, deux souris seulement meurent, le produit est acceptable.

Pharmacopée germanique. — Comme la pharmacopée française, la pharmacopée germanique préconise d'injecter d'emblée deux doses différentes à deux groupes de chacun 15 souris.

On injecte $0^{mg},37$ de novarsénobenzène par gramme d'animal à quinze souris et $0^{mg},42$ par gramme d'animal à 15 autres souris. Pour qu'un produit soit acceptable, il est nécessaire que dans le premier lot il survive onze souris et que dans le deuxième lot il en survive huit.

Pharmacopée japonaise. — Sur dix souris injectées à raison de $0^{mg},27$ de novarsénobenzol par gramme, sept souris doivent survivre pour qu'un produit soit considéré comme suffisant. D'après le rapport du Pr Hata de Tokio il semble bien que les souris japonaises sont plus sensibles que celles des pays occidentaux.

Pharmacopée des Etats-Unis. — Aux Etats-Unis il peut être, dans les mêmes conditions, fait usage officiellement du rat ou du lapin. L'essai sur le rat paraît le plus employé. Le poids des rats utilisés ne doit pas dépasser 150 grammes. On utilise cinq rats dont il doit survivre 60 pour 100 après injection intraveineuse de 24 centigrammes par kilogramme de novarsénobenzol.

4° *Sulfarsénol.*

Pour effectuer le contrôle du sulfarsénol, on peut utiliser la souris. On injecte simultanément par voie sous-cutanée à deux lots de cinq souris les doses de $0^{mg},4$ et $0^{mg},5$ par gramme d'ani-

mal au moyen d'une solution préparée en dissolvant 2 grammes de sulfarsénol dans 100 centimètres cubes d'eau distillée. L'essai est conduit comme pour l'arsénobenzol (Burn [4]).

II. MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE L'ACTION CURATIVE DES DÉRIVÉS DU TYPE ARSENO.

La détermination de l'action curative d'une substance est d'autant plus importante qu'elle ne semble pas, comme nous l'avons signalé ci-dessus, être absolument proportionnelle à la toxicité de cette substance. Deux sortes de méthodes sont préconisées par la conférence internationale de Francfort pour l'examen de l'efficacité curative, donc de l'activité thérapeutique des médicaments arsenicaux du type arséno ; les unes, dont nous décrirons une des techniques ci-dessous, utilisent des animaux infectés au moyen de trypanosomes, les autres infectent expérimentalement les animaux avec des spirochètes (Hata). Aucune de ces deux méthodes n'a été adoptée par la pharmacopée française.

Méthode utilisant les animaux infectés par des trypanosomes.

Technique de Voegtlin et H. Smith [5]. — Cette méthode est basée sur le fait que l'arsénobenzol et ses succédanés font disparaître le trypanosomia équiperdium du sang des souris infectées par cet organisme. Pour pratiquer cette infection on injecte dans la cavité péritonéale de 25 à 30 souris $0^{cm^3},5$ d'une suspension sanguine diluée avec du citrate de soude contenant 7 000 trypanosomes par millimètre cube.

Préparation de la solution contenant les trypanosomes. —

On prélève à un rat déjà infecté quelques gouttes de sang que l'on dilue dans du citrate de soude à 1/100. Cette solution est injectée à un rat sain auquel on prélève du sang par la veine marginale 3 ou 4 jours après l'injection. Si l'examen du sang au microscope indique que le nombre de trypanosomes est égal à celui des globules rouges, le rat est tué et son sang est mélangé à 15 ou 20 centimètres cubes d'une solution de citrate de soude à 1/100. On détermine le nombre de trypanosomes par millimètre cube. On dilue la solution de telle sorte qu'elle contienne 7 000 trypanosomes par millimètre cube. On utilise cette suspension pour infecter les souris.

Technique utilisée pour infecter les souris. — Deux jours après l'injection, le sang des souris infectées est examiné au microscope pour déterminer le nombre de trypanosomes qui existent par millimètre cube. On prélève 1 centimètre cube de sang dans un hématimètre que l'on remplit avec une solution préparée en mélangeant les solutions 1 et 2 dont la composition est donnée ci-dessous et en ajoutant 6 centimètres cubes d'une solution de formol à 40 pour 100.

Solution 1.

Glycérine	30 cm³.
H^2O	80 cm³.
Violet de Méthyle	0g,25.

Solution 2.

Sulfate de soude	8 g.
NaCl	1 g.
H^2O distillé	80 cm³.

Une goutte du contenu de la pipette est placée dans le champ du microscope et l'on compte les trypanosomes. On sépare, pour les utiliser ultérieurement, les souris dont le sang contient entre 100 000 et 500 000 organismes par millimètre cube. Ces souris sont pesées et mises en repos pendant trois heures. Sur

trente souris infectées, il est possible d'obtenir vingt souris ayant une infection uniforme,

1) **Détermination de l'action trypanocide du novarsénobenzol.** — On utilise deux solutions similaires, l'une préparée avec l'étalon, l'autre avec la substance dont on désire déterminer l'activité.

$0^{g},2$ de substance sont dissous dans 10 centimètres cubes d'eau distillée ; cette solution est diluée ultérieurement à 2 pour 100.

Chacune des solutions est injectée à 10 souris ; cinq souris infectées comme il a été décrit ci-dessus, reçoivent $0^{mg},03$ par gramme de souris et 5 autres souris $0^{mg},025$ par gramme de souris. L'injection est effectuée dans la veine de la queue. Le sang des souris est examiné au microscope tous les 2, 4, 6 jours. Après 6 jours on divise les souris en deux groupes ; d'une part, les souris dans le sang desquelles, après examen de différents champs, on peut admettre que le nombre des trypanosomes est réduit à quelques-uns, 2 ou 3 par millimètre cube, et d'autre part, celles dont le sang contient un nombre considérable de trypanosomes par millimètre cube. Les trypanosomes reparaissent dans les 10 ou 14 jours qui suivent, dans le sang des souris du premier groupe. Les souris du second groupe meurent en 2 ou 3 jours.

On compare les résultats obtenus avec l'étalon et avec la substance d'activité inconnue et l'on cherche les doses de la préparation à titrer qui ont le même pouvoir trypanocide que l'étalon. On peut ainsi exprimer l'activité de cette substance en fonction de la poudre étalon.

2) **Détermination de l'action trypanocide de l'arsénobenzol.** — Les essais sont effectués comme pour le novarsénobenzol, seules la préparation de la solution et les doses à injecter sont différentes. $0^{g},1$ d'arsenobenzol sont dissous dans 6 centimètres cubes d'eau distillée auxquels on ajoute $0^{cm^3},45$ d'une solution de

soude double dormale. On étend à 10 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Cette solution est diluée de nouveau pour que sa concentration atteigne 5/10 000.

On injecte dans la veine de la queue de cinq souris infectées $0^{mg},1$ par gramme de souris et à cinq autres $0^{mg},09$ par gramme d'animal. On pratique simultanément un essai identique avec l'étalon.

3) **Détermination de l'activité trypanocide du salvarsan argentique.** — On prépare une solution ayant pour titre 5 pour 10 000 ; cinq souris préalablement infectées sont injectées dans la veine de la queue avec $0^{mg},009$ par gramme d'animal et cinq autres avec $0^{mg},008$ par gramme d'animal. Le même essai est pratiqué simultanément avec l'étalon.

4) **Détermination de l'activité trypanocide du sulfarsénol.** — On prépare une solution de sulfarsénol à 0,02 pour 100. Les injections sont faites par voie sous-cutanée : on injecte à cinq souris préalablement infectées $0^{mg},04$ par gramme d'animal et à cinq autres souris $0^{mg},03$ par gramme d'animal. Le même essai est pratiqué simultanément avec l'étalon.

BIBLIOGRAPHIE

[1] *Publications of the League of nation* C 532, M. 183, 1925, 350.
[2] M. Durham, J. H. Gaddum, J. E. Marchal, *Medical Research Council. 128*, 1929, 1.
[3] J. W. Trevan, *Proc. Roy. Soc. 101*, 1927, 483.
[4] C. Burn, *Methods of Biological Assay*. Oxford University Press, 1928.
[5] L. Launoy et P. Nicolle, *Comp. R. Soc. Biolog. 96*, 1927, 1288 ; L. Launoy, *Comp. R. Soc. Biol. 97*, 1927, 324.
[6] Voegtlin et H. W. Smith, *J. Pharm. exp. Therap. 15*, 1920, 475.

CHAPITRE VI

INSULINE

Les troubles graves consécutifs à l'administration de doses élevées d'insuline ont nécessité son dosage biologique pour rendre plus général, en clinique, l'emploi d'un médicament si précieux.

Le dosage biologique de l'insuline peut s'effectuer suivant deux méthodes basées sur des principes différents ; la première consiste à déterminer la diminution de glycémie causée par injection d'insuline chez le lapin ; la seconde est basée sur la proportionnalité qui existe entre la dose d'insuline injectée à un certain nombre d'animaux et le nombre d'animaux auxquels cette dose provoque des convulsions.

Quelles que soient d'ailleurs les méthodes utilisées, l'activité d'un échantillon d'insuline doit toujours être évaluée par rapport à une poudre étalon.

Etalon d'insuline et unité internationale.

Le P^{r} Dale fut chargé par la Conférence d'Edimbourg de préparer et de conserver au Medical Research Council l'étalon d'insuline qui doit être constitué par une poudre sèche et amorphe de chlorhydrate d'insuline dont 1 milligramme représente 8 unités insuliennes ; autrement dit, 0^{mg},025 de poudre étalon représente l'activité de l'unité insulienne.

L'unité internationale ainsi définie est sensiblement égale à l'ancienne unité clinique[1] définie par l'Insulin Committee de l'université de Toronto et qui correspond au tiers de la quantité d'insuline qui abaisse la glycémie d'un lapin de 2 kilogrammes à jeun depuis 24 heures au taux du seuil convulsivant soit 0,045 pour 100.

Dans le tableau VIII se trouvent réunis les résultats qui établissent le rapport qui existe entre l'unité clinique et l'unité insulienne internationale d'après les travaux effectués dans divers laboratoires.

Tableau VIII.

	NOMBRE D'UNITÉS CLINIQUES CONTENUES dans 1 milligramme d'étalon d'insuline	RAPPORT EXISTANT ENTRE L'UNITÉ CLINIQUE et l'unité internationale
Insulin Committee of the University of Toronto.	8,5	$\frac{8,5}{8} = 1,06$
Lilly Research Laboratories. . . .	8,5	$\frac{8,5}{8} = 1,06$
Squibb et Sons Research Laboratories.	8,4	$\frac{8,4}{8} = 1,05$
Wellcome Physiological Research Laboratories..	8,8	$\frac{8,8}{8} = 1,1$
National Institute for Medical Research.	8,8	$\frac{8,8}{8} = 1,1$

La différence entre les deux unités cliniques et insuliennes est faible et même insignifiante en ce qui concerne l'emploi thérapeutique de l'insuline.

La conférence internationale de Genève recommande à chaque nation de préparer son propre étalon et de comparer l'activité de celui-ci avec l'échantillon étalon international.

1. L'unité clinique est le tiers de l'unité physiologique qui représente la quantité d'insuline qui abaisse le taux de la glycémie d'un lapin de 2 kilogrammes à jeun depuis 24 heures, à 0,045 pour 100.

I. MÉTHODES BASÉES SUR LA DÉTERMINATION DE LA GLYCÉMIE

Méthode préconisée par le Committee Insulin University Toronto. — Cette méthode permet de déterminer directement l'activité d'un échantillon d'insuline en unités cliniques. On utilise 6 à 12 lapins sélectionnés et pesant environ 2 kilogrammes. Ces animaux sont maintenus à jeun pendant 24 heures. On prélève par la veine marginale de l'oreille de chaque lapin 2 à 4 centimètres cubes de sang dans lequel on dose le sucre[1]. Ce sang est recueilli dans des tubes à essai stérilisés contenant un petit cristal de fluorure de sodium.

La glycémie normale de chaque lapin est fournie par le chiffre représentant la moyenne des résultats obtenus avec deux échantillons de sang prélevés à une demi-heure d'intervalle.

On injecte ensuite, par voie sous-cutanée, à chacun des lapins, une dose d'insuline ne provoquant pas de convulsions (environ 1 unité d'insuline pour un lapin de 2 kilogrammes). L'injection étant faite, les lapins sont placés dans une pièce maintenue à température constante pendant les 5 heures qui suivent l'injection. On prélève du sang par la veine marginale, à chaque lapin, à des heures préalablement fixées arbitrairement, par exemple 1 heure, 1 heure 1/2, 3 heures, 5 heures après l'injection d'insuline [4]. On prélève à chaque prise de sang $0^{cm^3},2$ à $0^{cm^3},4$ de sang que l'on recueille dans un même tube à essai contenant du fluorure de sodium. Après avoir mélangé le sang provenant des quatre prélèvements, on le sépare en 2 échantillons sur lesquels on effectue séparément le dosage du sucre.

1. L'Université de Toronto utilise pour la détermination de la glycémie la méthode de Schaffer-Hartmann [2]. Nous décrirons ci-contre les méthodes de Hagedorn-Jensen [3] et de Baudoin-Lewin [4] que nous utilisons au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de médecine de Paris pour la détermination de la diminution de glycémie provoquée par l'insuline.

La moyenne des deux dosages fournit la glycémie moyenne d'un lapin pendant les 5 heures qui suivent l'injection d'insuline.

Le nombre d'unités insuliennes contenues dans la poudre utilisée peut être dans un tel essai empiriquement calculé au moyen de la formule suivante :

Soient :
a la glycémie normale du lapin expérimenté ;
b la glycémie du même lapin après injection d'insuline ;
p le poids du lapin (kg.) ;
n le nombre de centimètres cubes d'insuline injectée ;
N l'activité de l'échantillon (unités cliniques par centimètre cube de préparation injectée).

$$N = \frac{a - b}{a - 0{,}045} \cdot \frac{p}{n} \cdot 1{,}5.$$

On fait la moyenne des résultats obtenus avec les 6 ou 12 lapins expérimentés.

Méthode de Marks [6]. — On effectue simultanément sur le même lapin deux dosages identiques, l'un avec la poudre étalon, l'autre avec l'échantillon à examiner.

1° On détermine la glycémie normale d'une série de 12 lapins maintenus à jeun depuis 24 heures et pesant environ 2 kilogrammes.

2°) A la moitié de ces animaux on injecte, par voie sous-cutanée, une dose de poudre étalon correspondant à une demi-unité insulienne par kilogramme d'animal ; à l'autre moitié, on injecte une dose supposée équivalente de la préparation à titrer. On prélève par la veine marginale de l'oreille à chacun des lapins $0^{cm3},4$ de sang toutes les heures, par exemple pendant les 5 heures qui suivent l'injection. On recueille le sang dans un tube contenant du fluorure de sodium. On sépare le sang en deux échantillons distincts sur lesquels on dose le sucre. On fait ensuite la moyenne des deux essais et on détermine ainsi la glycémie moyenne d'un lapin pendant les cinq heures qui suivent l'injection d'insuline.

Après quelques jours on recommence l'expérience en injectant aux lapins qui ont reçu l'étalon, la préparation de titre inconnu et la poudre étalon aux autres lapins.

Soient a la glycémie normale,

b la glycémie après l'injection d'insuline étalon.

La diminution pour 100 de glycémie est donnée par la formule $\frac{a-b}{a} \times 100$.

On fait alors la moyenne D des diminutions pour 100 de glycémie obtenues avec tous les lapins expérimentés avec l'étalon. On effectue le même calcul pour l'échantillon à titrer et on détermine D' la moyenne des diminutions pour 100 de glycémie.

La valeur pour 100 de l'échantillon examiné par rapport à l'étalon est donnée par la formule : $\frac{100\,D'}{D}$.

Dosage du sucre du sang. — Pour doser le sucre du sang il est avantageux de s'adresser à des microdosages qui utilisent une petite quantité de sang. Nous décrirons parmi les nombreuses microméthodes qui peuvent être employées celles de Hagedorn-Jensen et de Baudoin-Lewin dont la première nous paraît à la fois la plus rapide et la plus exacte.

Méthode de Hagedorn-Jensen [3]. — Cette méthode utilise l'action réductrice des sucres qui, en milieu alcalin, transforment une solution de ferricyanure de potassium en ferrocyanure de potassium

$$K^6Fe^2(CN)^{12} + 2\,KOH = 2\,K^4Fe(CN)^6 + H^2O + O.$$

On dose le ferricyanure non transformé par la méthode iodométrique et on en déduit la quantité de sucre entrée en réaction.

Technique. — Le sang dans lequel on désire doser le sucre est désalbuminé. Pour cela on place dans un tube à essai, 1 cen-

timètre cube de soude décinormale, 5 centimètres cubes d'une solution de sulfate de zinc à 45 100 diluée au centième au moment de l'emploi. $0^{cm3},1$ de sang prélevé au moyen d'une micropipette. On maintient le tout 4 à 5 minutes au bain-marie. On filtre ; on ajoute au filtrat 2 centimètres cubes d'une solution préparée comme suit :

Ferricyanure de potasse pur. . . .	$1^g,65$.
Carbonate de sodium pur et anhydre .	$10^g,6$.
Eau q. s. pour.	1000 cm^3.

On chauffe le tout 15 minutes au bain-marie, puis on refroidit. On dose le ferricyanure non transformé en ajoutant 3 centimètres cubes de la solution 1 et 2 centimètres cubes de la solution 2. L'iode se dégage en quantité correspondant au ferricyanure restant, suivant l'équation

$$Fe^2(CN)^{12}K^6 + 2KI = 2Fe(CN)^6K^4 + 2I$$

On titre l'iode en liberté au moyen d'une solution d'hyposulfite $\frac{N}{200}$.

Hagedorn et Jensen [1] ont dressé des tables sur lesquelles on peut lire directement la quantité de sucre contenu dans $0^{cm3},1$ de sang en fonction de la quantité d'hyposulfite utilisée.

Solution 1.

Iodure de potassium.	5 g.
Sulfate de zinc.	10 g.
Chlorure de sodium..	50 g.
Eau q. s. pour.	200 cm^3.

Solution 2.

Acide acétique cristallisable. .	3 cm^3.
Eau q. s. pour..	100 cm^3.

Méthode de Baudoin-Lewin [4]. — Cette méthode utilise

1. Ces auteurs ont tenu compte dans l'établissement des tables de la réduction que subit normalement une solution de ferricyanure.

la réduction d'une solution d'iodure double de mercure et de sodium au moyen des sucres.

On détermine la quantité de mercure ainsi libéré en ajoutant une quantité d'iode connue dont une partie est transformée en iodure mercurique et dont l'excès est dosé au moyen d'hyposulfite.

Technique. — La défécation a lieu de la façon suivante ; à 1 centimètre cube de sang ou à 1 centimètre cube de plasma fluoré on ajoute 4 centimètres cubes d'eau distillée puis 1 centimètre cube du réactif nitromercurique. Après agitation, il se forme un coagulum noirâtre qui s'épaissit. On ajoute 1 centimètre cube de soude normale pure. La majeure partie de l'excès de mercure est précipitée à l'état d'oxyde jaune. On ajoute de l'eau pour obtenir un volume total de 30 centimètres cubes. Le liquide limpide obtenu après filtration des albumines, ne renferme que des traces de mercure, on peut effectuer le dosage du glucose sur 15 centimètres cubes du filtrat. On ajoute alors 1 centimètre cube de solution de soude normale pure et 1 centimètre cube de la solution iodo-mercurielle [1] (solution 3) puis on chauffe le tout au bain-marie bouillant ; après 3 minutes le mercure se sépare. Pour le doser, on ajoute 2 centimètres cubes de la solution 4 ; il se dégage de l'iode qui transforme le métal en iodure mercurique. L'excès d'iode non utilisé est titré au moyen d'hyposulfite centinormal en présence d'empois d'amidon.

Solution 3.

Iodure mercurique.	3gr,60
Iodure de sodium desséché.	12 g.
Eau distillée q. s.	100 cm³.

Solution 4.

Iodate de potasse pur.	1,783
Acide sulfurique pur à 5 pour 100.. . . .	1000 cm³

1. Il peut être avantageux d'ajouter quelques centimètres cubes d'une suspension de sulfate de baryte (Fleury, *Journ. de Pharm. et de Chimie 10*, 1929, 292).

Soit « n » le nombre de centimètres cubes d'hyposulfite centinormal utilisé. La quantité de glucose contenu dans 1 centimètre cube de sang ou de plasma est donnée par la formule

$$\frac{10 - n}{1{,}24}.$$

II. MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTION CONVULSIVANTE DE L'INSULINE

Ces méthodes sont basées sur la proportionnalité qui existe entre la dose d'insuline injectée et le nombre d'animaux, souris et lapins, auxquels cette dose provoque des convulsions quand on utilise un nombre suffisant d'animaux. Nous donnons ci-dessus deux méthodes parmi lesquelles la seconde paraît la plus précise.

1) ***Méthode préconisée par les conférences internationales.*** — Cette méthode est applicable aux souris comme aux lapins. Elle consiste à injecter la poudre étalon à un certain nombre d'animaux placés dans des conditions identiques et maintenus à une température constante d'au moins 30°. La dose qui provoque des convulsions ou du collapsus à la moitié du lot d'animaux est déterminée.

On répète la même expérience avec la poudre à examiner. Le rapport des deux doses ainsi obtenues exprime la valeur comparative de l'échantillon à titrer par rapport à l'étalon.

2) ***Méthode de Trevan et Ellen Boock*** [7]. — Ces auteurs utilisent comme animal d'expérience la souris et opèrent comme suit. Ils injectent par voie sous-cutanée à un certain nombre de souris, 50 ou 100, divisées en quatre groupes égaux et conservées dans des cages de zinc placées dans un bain d'eau mainte-

nue à une température rigoureusement constante de 38°, des doses diverses d'étalon d'insuline variant de 0,0075 à 0,01 unité clinique par 20 grammes d'animal. Le nombre d'animaux atteints de convulsions hypoglycémiantes dans les deux heures qui suivent l'injection d'insuline est noté. La température de 38° à laquelle sont maintenus les animaux favorise l'état convulsivant. Mais, néanmoins, comme il reste toujours difficile d'apprécier un léger degré d'effet hypoglycémiant on peut, dans les cas douteux, placer l'animal sur le dos et observer sa réaction ; si la souris ne reprend pas instantanément sa position normale on peut admettre que l'effet hypoglycémiant est atteint.

Trevan et E. Boock construisent une courbe en portant en abscisses les doses d'insuline étalon injectées et en ordonnées le pourcentage des animaux ayant eu des convulsions. C'est cette courbe qui permet de restreindre le nombre des essais dans la détermination de l'activité d'une poudre d'insuline. Car si la sensibilité individuelle des animaux varie chaque jour, ce qui oblige à comparer en même temps, sur une même souche de souris, le produit à examiner et l'étalon, la proportionnalité qui existe entre la dose injectée et les animaux atteints de convulsions reste constante.

Pour effectuer un dosage d'insuline il suffit donc d'injecter à deux groupes de souris maintenues dans les conditions décrites ci-dessus, deux doses, l'une de l'étalon et l'autre de l'échantillon à examiner, doses inférieures à la dose mortelle mais suffisantes pour provoquer des convulsions et de noter les pourcentages des animaux atteints de convulsions. D'après ces pourcentages on peut déduire sur la courbe étalon, les doses de l'étalon produisant le même effet et ainsi déterminer l'activité d'un échantillon d'insuline en unités internationales.

BIBLIOGRAPHIE

[1] The biological standardisation of insuline. *League of Nations Health Organisation*. C. H. 398, 1926.
[2] P. A. Shaffer et F. A. Hartmann, *Journ. Biol. Chem. 95*, 1920, 365.
[3] Hagedorn et Jensen, *Ugeskrift for Läger* 1918, n° 31; *Biochem Zeitsch. 135*, 1923, 46.
[4] A. Baudoin et J. Lewin, *Bul. Soc. chim. biol. 9*, 1927, 280.
[5] J. J. R. Macleod et C. S. Eadie, *Am. journ. Physiol. 64*, 1923, 285.
[6] H. P. Marks, *League of Nations*. C. H. 398, p. 57.
[7] J. W. Trevan et Ellen Boock, *League of Nation*. C. H. 398, p. 47.

CHAPITRE VII

PRÉPARATIONS DE THYROIDE

La teneur en principe actif et l'activité thérapeutique spécifique des préparations à base de thyroïde étant proportionnelles à la quantité d'iode combiné contenue dans le produit, il ne semble pas indispensable de recourir, en ce qui concerne le titrage de la thyroïde, à une méthode biologique. Cependant comme une préparation peut être artificiellement enrichie d'iode il est recommandé par les commissions internationales de vérifier par voie biologique l'activité [1] d'une préparation thyroïdienne au moyen par exemple de la méthode de l'acétonitrile de Reid Hunt [1] modifiée par Haffner et Komiyama [2].

Contrôle de l'activité des préparations de thyroïde.

Méthode à l'acétonitrile de Reid Hunt [1] ***modifiée par Haffner et Komiyama*** [2]. — Cette méthode utilise la propriété de l'extrait thyroïdien d'augmenter le métabolisme et par conséquent de diminuer la toxicité de l'acide cyanhydrique produit de dégradation dans l'organisme de l'acétonitrile.

Haffner et Komiyama ont montré que 24 heures après administration de 10 milligrammes de thyroïde à des souris conser-

1. Nous n'avons pas décrit ici les expériences effectuées au moyen de la thyroïde sur les métamorphoses des larves des têtards.

vées à une température constante (18 ou 19°) la dose minimum mortelle d'acétonitrile était augmentée de 100 pour 100.

Cependant comme l'augmentation de résistance d'un animal n'est pas strictement proportionnelle à la quantité de thyroïde administrée mais dépend de la saison, de la température et du régime des animaux utilisés, les essais doivent être faits comparativement à une poudre étalon (poudre étalon international ou poudre dont l'activité a été éprouvée cliniquement).

Etalon et unité internationale de thyroïde. — Le Pr Reid Hunt est chargé de préparer et de conserver l'étalon international qui doit être constitué par une poudre desséchée de thyroïde contenant 2 pour 100 d'iode.

Les commissions internationales ont proposé que l'unité internationale de thyroïde exprime l'activité contenue dans 10 milligrammes de poudre étalon.

Les souris qui reçoivent 10 milligrammes de cette poudre, soit une unité internationale par 20 grammes de poids, devront résister à l'injection de la dose minimum mortelle d'acétonitrile.

1° *Détermination de la dose minimum mortelle d'acétonitrile.* — On utilise des souris mâles de 15 à 20 grammes conservées à la température constante de 18 ou 20° et privées de nourriture quatre heures avant l'expérience. On leur injecte par voie intraveineuse une solution préparée avec 9 grammes d'acétonitrile dissous dans 100 centimètres cubes de sérum physiologique et on détermine la dose minimum mortelle qui est d'environ $0^{mg},9$ par gramme de souris.

2° *Evaluation de la résistance à l'acétonitrile des souris auxquelles on administre de la poudre de thyroïde.*

On expérimente sur quatre lots de six souris chacun. On administre aux souris du premier lot, une suspension de thyroïde à 5 pour 100, par voie buccale, à raison de $0^{cm3},3$, soit 10 milligrammes de poudre par 20 grammes de poids de souris ; les souris du lot 2 reçoivent $0^{cm3},2$ d'une solution à 3,3 pour 100, soit $6^{mg},6$ de thyroïde ; les souris du lot 3 reçoivent $0^{cm3},2$ d'une

solution à 2,2 pour 100, soit $4^{mg},4$ de thyroïde ; les souris du quatrième lot sont utilisées comme témoins. Vingt quatre heures après ce traitement, les souris sont laissées à jeun pendant 4 heures puis pesées à nouveau. On leur injecte par voie intraveineuse une solution d'acétonitrile à 9 pour 100. Les souris des lots 1 et 2 reçoivent 5/3, 6/3, 7/3 de la dose mortelle d'acétonitrile [1]. Les souris du lot 3 reçoivent 4/3, 5/3, 6/3, de la dose mortelle d'acétonitrile. Enfin les souris du lot 4, qui servent de témoins, reçoivent 3/4, 4/4 et 5/4 de la dose mortelle d'acétonitrile.

Les souris sont conservées à 18-20° puis examinées après vingt-quatre heures. Si toutes les souris du lot 1, les souris du lot 2 qui ont reçu 5/3 de la dose mortelle d'acétonitrile, les souris du lot 3 qui ont reçu 4/3 de la dose mortelle, les souris du lot 4 qui ont reçu 3/4 de la dose mortelle survivent, on peut en conclure que 10 milligrammes de la poudre examinée possèdent un activité égale à une unité internationale. Les différents essais qui permettent d'évaluer l'activité d'une préparation de thyroïde ont été résumés dans le tableau IX.

Tableau IX.

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4
Poids de thyroïde en mg. donnée par voie buccale pour 20 g. de souris.	10	6,6	4,4	0
Fraction de la dose minimum mortelle d'acétonitrile injectée à deux souris [2].	**7/3** **6/3** **5/3**	7/3 6/3 5/3	6/3 5/3 **4/3**	5/5 4/4 **3/4**

2. Les doses d'acétonitrile qui ne doivent pas produire la mort sont indiquées en caractères gras.

1. On injecte la même dose à deux souris de chaque lot.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Reid Hunt, *Archiv. Int. Med. 35,* 1925, 671 ; *Journ. biol. Chem. 1,* 1905, 133 ; *Am. Journ. Phys.* 63, 1923, 257. — Reid Hunt et A. Seidell, *Journ. Pharm. and exp. Therap.* 2, 1910, 15 ; *Hyg. Lab. Bul.*, n° 47.
[2] F. Haffner et T. Komiyama, *Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 107,* 1925, 69.

CHAPITRE VIII

DROGUES ANTHELMINTHIQUES

Parmi les diverses drogues anthelminthiques utilisées en clinique, il en est certaines dont la préparation doit être soumise à un contrôle rigoureux, étant donné leur grande toxicité. Aussi de nombreux travaux ont-ils été effectués dans le but d'évaluer l'activité biologique de ces substances.

Les commissions internationales ont, en particulier, préconisé le contrôle biologique de la fougère mâle. Quant à l'essence de chénopodium pour laquelle les méthodes de dosage biologique au moyen de vers de terre paraissent moins précises que la détermination de la teneur de cette substance en ascaridol par la méthode colorimétrique, il n'a été formulé aucune recommandation spéciale en ce qui concerne son contrôle biologique.

Fougère mâle.

L'essai biologique de l'extrait éthéré de fougère mâle peut être effectué soit sur des vers de terre (Lumbricus terrestris, Allolobophora faetida) par la méthode proposée par Straub [1], soit sur de petits poissons de 5 à 10 centimètres de longueur (Gobio, Carassius, Scardinius), comme le demande Knaffl-Lenz en se basant sur les travaux de Wasicky [2].

On immerge les vers de terre ou les petits poissons[1] dans une

1. Les travaux de Mlle Bachrach [3] ont montré que pour déterminer des

solution aqueuse d'extrait de fougère mâle, saturée de magnésie, préparée à partir des bases de pétioles ou du rhizome et l'on cherche la concentration minimum qui amène la mort de tous les animaux en quelques heures.

Une solution aqueuse à 0,002 pour 100 soit 2 pour 100 000 d'extrait éthéré de fougère mâle doit amener la mort des vers de terre de grandeur moyenne ou de petits poissons de 5 à 10 centimètres de longueur, alors qu'ils vivent dans une solution plus diluée titrant de 1 pour 100 000 à 1 pour 1 000 000[1].

BIBLIOGRAPHIE

[1] W. Straub, *Archiv. für die gesamte Phys.* 79, 1900, 379 ; *Archiv. f. exp. Path. u. Ph. 48, 1902,* 1.
[2] R. Wasicky, *Archiv. f. exp. Pathol. u. Pharm. 97,* 1923, 454.
[3] Eudoxie Bachbach, *Comp. Rend. Soc. Biol. 84,* 1921, 357 ; *Bul. Scienc. pharm. 35,* 1928, 15.
[4] Silvio Rebello, S. F. Gomes Da Costa et J. Toscano Rica, *Comp. rend. Soc. Biol. 96,* 1926, 918, 92 et 1926 ; *97,* 1927, 780 ; *98,* 1928, 470, 995.

toxicités relatives au moyen de poissons d'une espèce déterminée il faut, d'une part opérer dans des vases de même forme, de même volume, et d'autre part fournir à chaque poisson un certain volume d'eau sous une hauteur fixée expérimentalement.

1. Les travaux de Silvio Rebello, S. F. Gomes de Costa et J. J. Toscano Rica [4], poursuivis par ces auteurs depuis quelques années, ont montré que les différents anthelminthiques ont sur les parasites de l'intestin de chien et de porc des différences d'action dues à leur sensibilité très diverses. De plus, ces auteurs ont montré qu'il n'y a pas de rapport entre la sensibilité des Helminthes de l'intestin et celle des vers de terre et des petits poissons, ce qui évidemment diminue la valeur de l'essai biologique effectué sur ces animaux d'autant plus que les déterminations ne sont pas faites par rapport à un étalon.

TROISIÈME PARTIE

ESSAIS ET DOSAGES BIOLOGIQUES NON ENCORE ENVISAGÉS PAR LE COMITÉ D'HYGIÈNE DE LA SOCIÉTÉ DES NATIONS

CHAPITRE I

ANTITHERMIQUES

Les médicaments de l'hyperthermie sont le plus souvent à la fois analgésiques et antithermiques. Leur action antithermique qui est la seule que nous envisagerons ici, ne se produit d'ailleurs aux doses thérapeutiques, que chez l'individu en état d'hyperthermie. Cette particularité rend difficile leur étude pharmacodynamique qui ne peut être effectuée chez l'homme malade dont les états hyperthermiques ne sont pas comparables, mais qui peut avoir lieu chez des animaux rendus hyperthermiques soit au moyen de la piqûre thermique, soit par injection de toxines, de produits septiques ou de certaines substances chimiques[1].

I. HYPERTHERMIE TRAUMATIQUE.

La piqûre thermique fut découverte simultanément par Richet [1] et Ott [2] puis étudiée par Aronson et Sachs [3]. Ces auteurs utilisent le lapin qui est trépané dans la région voisine de l'intersection des sutures coronales et sagittales. L'ouverture

1. Les injections sous-cutanées de petites doses de β-tétrahydronaphtylamine (Stern [4], Jonescu [5], Feri [6]) provoquent chez le lapin une augmentation de la température de deux degrés en deux heures ; mais l'hyperthermie due à cette substance n'est pas absolument identique à celle qui est produite par les produits septiques, car elle résiste le plus souvent à l'emploi des antithermiques habituellement employés (antipyrine, quinine). Aussi cette substance ne peut pas être utilisée dans le but de comparer entre eux les différents antithermiques,

crânienne qui doit avoir 6 à 8 millimètres de diamètre a son centre sur la suture coronale à 5 millimètres de la ligne médiane. On incise la dure mère et par l'ouverture on introduit une fine baguette de verre de 3 à 4 millimètres d'épaisseur ou une aiguille qu'on plonge verticalement jusqu'à la base du crâne sans léser le corps strié et la région sous-jacente. Toute l'opération doit être faite aseptiquement. Il se produit bientôt une élévation de la température qui peut atteindre 41 ou 42° et s'y maintenir pendant près de 24 heures, pour s'abaisser ensuite progressivement jusqu'à son niveau habituel.

Cette opération n'affecte pas l'état général de l'animal : pourtant, si on répète les piqûres, le lapin se cachectise.

Quelques heures après avoir effectué la piqûre thermique, quand la température rectale du lapin atteint son maximum, on introduit la substance antipyrétique soit par voie intraveineuse, soit encore par voie buccale. On suit les variations de la température rectale, d'une part sur un lapin témoin qui a subi la piqûre thermique, d'autre part sur un lapin ayant reçu l'antithermique après avoir subi la piqûre thermique. Après quelques jours, on peut répéter l'expérience en donnant l'antithermique au lapin témoin et en se servant comme témoin du lapin ayant reçu l'antithermique. Cette méthode qui fournit une hyperthermie durable serait la seule recommandable si les résultats étaient constants et la technique moins délicate, mais elle donne lieu à de fréquents échecs et, parfois même, si l'on n'atteint pas la région du tuber cinereum, on obtient de l'hypothermie.

II. HYPERTHERMIE SEPTIQUE.

Il est possible de réaliser cette hyperthermie par voie intraveineuse chez le lapin, en injectant une macération de levure de bière, une infusion de foin, ou une culture microbienne quelconque.

L'hyperthermie consécutive à ces injections ne se prolonge souvent que peu de temps. Souvent l'hyperthermie est moins durable que l'action antithermique ce qui rend les expériences comparatives difficiles et nécessite l'emploi de faibles doses d'antithermique.

1) ***Hyperthermie due à l'injection intraveineuse de levure de bière*** (*Méthode de P. Nicolle* [7]).

Cette méthode qui consiste dans l'injection d'une macération de levure de bière fournit une hyperthermie d'intensité constante mais malheureusement peu durable. Malgré cet inconvénient, elle peut être utilisée pour les essais comparatifs de l'activité de deux antithermiques.

Préparation de la macération de levure de bière. — 100 grammes de levure de bière fraîche sont additionnés de 10 fois leur poids d'eau distillée. Le mélange est porté à la glacière et agité fréquemment. Au bout de trois à quatre jours, on filtre sur papier Chardin puis sur bougie Chamberland. On conserve le filtrat dans des fioles stérilisées. On effectue toutes les expériences concernant une même série d'hyperthermiques avec les échantillons d'une même macération.

Mode opératoire. — Pour déterminer l'activité d'un antithermique, on opère comme suit : un lapin est utilisé comme témoin ; un second lapin reçoit une macération de levure ; un troisième reçoit primitivement la macération de levure puis l'antithermique dont on veut déterminer l'activité ; un quatrième lapin reçoit la macération de levure puis l'antithermique étalon. Etant donné la constance de l'hyperthermie observée avec la macération de levure, il ne paraît pas absolument indispensable dans un simple essai biologique d'effectuer l'essai comparatif de l'étalon et de l'antithermique sur le même lapin.

1° On injecte par voie intraveineuse à trois lapins dont on

prend la température rectale depuis quelques jours, de 10 à 15 centimètres cubes de macération de levure de bière et l'on note, tous les quarts d'heure environ, la température rectale qui atteint son maximum (41° à 41°,5) deux ou trois heures après l'injection et qui reste plus élevée que la normale pendant 6 à 7 heures.

Tableau X.

	LAPIN 1 (témoin)	LAPIN 2	LAPIN 3	LAPIN 4
Temps	NORMAL Température	NORMAL Température	NORMAL Température	NORMAL Température
0	39°,2	39°	39°,8	39°,2
		Injection intraveineuse de 10 cm³ de macération de levure de bière		
TEMPS (heures)	ÉLÉV. TEMP.	ÉLÉV. TEMP.	ÉLÉV. TEMP.	ÉLÉV. TEMP.
1/2	0,1	»	»	»
3/4	»	0,6	0,8	»
1 h.	0,1	1,2	1,8	1
1 h. 1/4	»	»	1,8	1,4
1 h. 1/2	0,1	1,3	1,8	1,6
1 h. 3/4	0,1	»	antipyrine 0g,40 par voie intra-veineuse	antodyne-acétone 1 gramme par voie buccale
2 h.	0,1	1,8	»	1
2 h. 1/4	0,1	»	0,9	0,3
2 h. 1/2	0,1	1,8	»	»
2 h. 3/4	0,1	1,8	0,7	0,4
3 h. 3/4	0,1	1,8	0,6	1,4
4 h. 3/4	0,1	1,8	0,5	1,4
5 h. 3/4	0,1	1,8	0	1,2
6 h. 3/4	0,1	1,8	0	1,2

2° On administre à un des trois lapins qui ont reçu la macération de levure de bière, 1 heure à 1 h. 1/2 après l'injection, l'antithermique dont on veut déterminer l'activité. On prend tous les quarts d'heure environ la température rectale de l'animal.

3° On opère d'une façon identique avec la substance antithermique étalon.

4° On construit sur la même feuille de papier quadrillé trois courbes correspondant, l'une au lapin qui a reçu uniquement la levure de bière, la seconde à l'animal qui a reçu l'antithermique à examiner, la troisième au lapin qui a reçu l'antithermique type. Pour construire ces courbes on porte en abscisses le temps et en ordonnées l'élévation de température. La comparaison de ces courbes permet d'évaluer l'activité d'un antithermique par rapport à un autre antithermique dont l'activité clinique est bien connue.

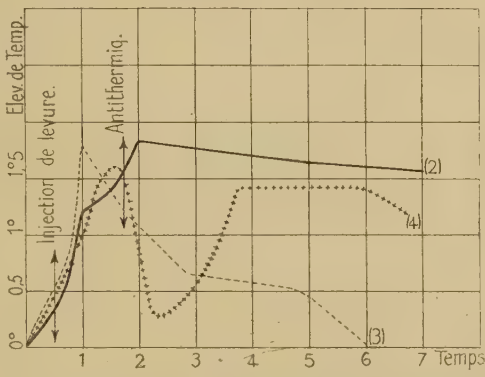

FIG. 9. — *Courbes permettant l'estimation de l'activité d'un antithermique (Méthode de Pierre Nicolle).*

La courbe 2 représente les variations de température que subit un lapin ayant reçu une injection intraveineuse de 10 centimètres cubes de macération de levure de bière. La courbe 3 (en pointillé) représente les variations de température que subit un lapin ayant reçu 10 centimètres cubes de macération de levure de bière puis 40 centigrammes d'antypyrine par voix intraveineuse. La courbe 4 (en croix) représente les variations de température que subit un lapin ayant reçu 10 centimètres cubes de macération de levure de biére et 1 gramme d'antodyne-acétone par voie buccale.

La courbe 2 correspond au lapin n° 2; la courbe 3 au lapin n° 3; la courbe 4 au lapin n° 4.

Exemple : Détermination du degré d'activité du dérivé acétonique du phénoxypropanediol (antodyne-acétone[1]*) par rapport à celle de l'antipyrine).*

On opère comme il a été indiqué ci-dessus. Nous indiquons dans le tableau X ci-dessus les résultats obtenus.

D'après les courbes représentées sur la figure 9 il est facile

1. Cette substance a été préparée au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine (section de chimie).

de voir que l'action de l'antodyne-acétone utilisé à la dose de 1 gramme par voie buccale agit moins longtemps que $0^{g},40$ d'antipyrine injectée par voie intraveineuse.

Pour avoir une estimation plus parfaite de l'activité de cette substance, il faudrait comparer son action à celle de diverses doses d'antipyrine.

2) *Hyperthermie due à l'injection hypodermique d'une culture de bacillus coli communis* (*Méthode de Kiliani* [8]).

Kiliani injecte par voie sous-cutanée à un lapin 2 centimètres cubes du filtrat d'une culture de Bacillus coli communis (bacille cultivé pendant trois semaines à 30-37 degrés puis tué par chauffage à 100° pendant un quart d'heure), ainsi que $0^{cm^3}2$ du résidu microbien. La température rectale du lapin s'élève de 0°,5 en une heure et de 1° à 2° en deux heures et se maintient sans variations nouvelles du maximum pendant douze heures. On injecte l'antithermique pendant la période d'élévation thermique. On peut comparer sur un même animal l'action d'un antithermique quelconque avec l'aspirine ou l'antipyrine. Les deux essais effectués sur le même animal doivent être séparés par un intervalle d'une semaine. Il est nécessaire d'employer dans les deux essais le même échantillon de bacillus coli communis.

BIBLIOGRAPHIE

[1] C. Richet, *Compt. R. Ac. Sc. 98,* 1884, 827.
[2] Ott, *Journ. of nervous and mental diseases,* 1884.

[3] Aronson et Sachs, *Pflügers Archiv. 37,* 1885, 232.
[4] R. Stern, *Virchows Archiv. 115,* 1889, 14.
[5] O. Jonescu, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 160,* 1909, 358.
[6] K. Feri, *Archiv. inter. de Pharm. et de Thérap. 21,* 1911, 27.
[7] Pierre Nicolle, *Archiv. de Thérap. de l'Institut Pasteur de Tunis 14,* 1925, 325.
[8] M. Kiliani, *Archiv. inter. de Pharm. et de Thérap. 20,* 1910, 333.

CHAPITRE II

MYOTIQUES ET MYDRIATIQUES

L'étude pharmacodynamique des substances pouvant provoquer du myosis ou de la mydriase a été effectuée sur les yeux de grenouille, de lapin, de chat et d'homme. D'une façon générale, pour apprécier l'activité d'un myotique ou d'un mydratique, les auteurs se sont contentés de déterminer la concentration minimum capable de provoquer un certain degré de mydriase ou de myosis. Récemment, Poos [1] utilisant les muscles isolés de l'iris (dilatateur et constricteur irien) a précisé le mécanisme de l'action des substances myotiques et mydriatiques sans toutefois donner une méthode de dosage plus précise que celles qui avaient déjà été préconisées.

Parmi les méthodes utilisées pour l'essai des myotiques et des mydriatiques, nous décrirons celle de Munch [2] qui emploie l'œil de chat in situ et celle qui est basée sur l'examen des yeux énucléés de grenouille (Jeanne Lévy et R. Hazard [3]).

Essai sur le chat.

Cette méthode, étudiée par Munch, consiste en la détermination de la plus faible concentration produisant le même degré de mydriase qu'une solution étalon de concentration connue. Elle utilise comme animal d'expérience le chat.

Les chats sont choisis de poids variant de 1 à 2 kilogrammes. Pour l'expérimentation, on place l'animal à une distance fixe

d'une lampe électrique de 100 watts, et on détermine dans ces conditions le maximum de contractilité des pupilles. On ajoute $0^{cm3},05$ d'une solution étalon de concentration connue entre la paupière inférieure et l'œil de l'animal, le deuxième œil servant de témoin. Quelques heures après, on examine les deux pupilles et on détermine la différence de leur diamètre.

Après 24 heures de repos, on peut utiliser le même chat pour faire une détermination semblable avec la substance à examiner. Des solutions plus concentrées et plus diluées sont étudiées sur d'autres animaux. On choisit pour déterminer la concentration minimum active celle qui diminue ou augmente le diamètre pupillaire de 0,5 à 1 millimètre. On continue les essais jusqu'à ce qu'on obtienne le même degré de mydriase ou de myosis avec l'étalon et avec la substance d'activité inconnue. On en déduit la valeur myotique ou mydriatique de la substance examinée par rapport à celle de l'étalon. Les chats présentent de grandes différences de sensibilité vis-à-vis des alcaloïdes, mais si la concentration minimum active est variable suivant les animaux utilisés, elle reste constante, pendant quelques semaines, pour le même animal.

Essai sur l'œil énucléé de grenouille.

Cette méthode qui ne permet pas de déterminer d'une façon absolue le titre d'une solution d'alcaloïde, est néanmoins suffisante pour comparer entre eux deux mydriatiques ou deux myotiques et pour fixer leur valeur relative. Elle utilise l'œil énucléé de grenouille privé de ses connexions nerveuses.

Technique. — La grenouille est décapitée. La tête est incisée suivant la ligne médiane, chaque partie est saisie avec une pince et au moyen de ciseaux à pointes mousses on élimine la peau pour arriver à l'orbite qui est incisée latéralement. A ce moment on saisit, avec la pince, la peau de la paupière et on

dégage l'œil en le débarrassant à petits coups de ciseaux de toutes les membranes accessoires. L'œil qui ne doit avoir subi aucune lésion, est placé dans un verre de montre contenant une solution de Ringer. On répète les mêmes opérations sur l'autre œil. Après avoir exposé les deux yeux à une lumière assez forte pour provoquer un certain degré de myosis, on les place à l'abri de la lumière directe et on les maintient à la même intensité lumineuse pendant toute la durée des déterminations.

Pour évaluer avec précision les modifications que subissent les dimensions de la pupille, on porte jusqu'au contact des bords de la pupille les pointes d'un tire-ligne, et l'on mesure l'écartement des branches de celui-ci sur une règle graduée. On obtient ainsi la dimension des deux diamètres. *a* transversal et *b* longitudinal qui permettent d'évaluer la surface de l'ellipse pupillaire suivant la formule $S = \frac{\pi ab}{4}$. On détermine primitivement la surface normale des deux yeux, puis on verse dans l'un des verres de montre la solution du produit à examiner dont le volume doit être suffisant pour que l'œil soit entièrement baigné par le liquide. On verse, au même moment, sur le second œil, la solution qui doit servir d'étalon et qui est choisie parmi celle dont le mécanisme de l'action pharmacodynamique se rapproche le plus possible de celui de la substance à examiner[1].

Lorsque le produit est soluble dans l'eau, on le dissout dans l'eau physiologique ou dans du liquide de Ringer en s'assurant que les solutions ont des *p*H voisins de 6,8. Lorsque le produit est insoluble dans l'eau, mais est soluble dans l'huile, on emploie pour le dissoudre de l'huile d'olive débarrassée des acides gras libres, par lavage à l'alcool.

1. Suivant l'étalon choisi il est possible de pratiquer, soit une comparaison de l'activité myotique ou mydriatique de deux substances, soit un dosage biologique. Nous donnons dans l'exemple ci-contre la technique d'un dosage biologique d'une solution d'atropine de titre inconnu par rapport à une solution d'atropine titrée.

On détermine l'action des substances sur les yeux au moyen de mesures faites à intervalles réguliers, toutes les cinq à dix minutes par exemple, pendant soixante minutes. On cherche à déterminer la concentration qui commence à agir en moins de quinze minutes et on note l'augmentation maximum obtenue en soixante minutes. On détermine la dilution de la substance d'activité inconnue qui possède la même action qu'une solution étalon provoquant en soixante minutes une augmentation de la surface pupillaire initiale de plus de 10 pour 100.

Exemple. — Dosage d'une solution d'atropine de titre x.

On utilise comme étalon une solution d'atropine titrée. L'essai est conduit comme il a été indiqué ci-dessus.

Nous transcrivons dans le tableau XI deux séries d'expériences effectuées avec la solution de titre x et avec une solution d'atropine à 2 pour 100. Les augmentations maxima des pupilles provoquées en 60 minutes par la solution à examiner et par la solution d'atropine étalon, ainsi que les augmentations maxima rapportées à une pupille normale de 100 millimètres carrés ont été calculées. On en déduit la différence qui existe entre les augmentations maxima pour cent des deux pupilles expérimentées.

Dans le tableau XII, il a été résumé une série d'essais effectués avec cinq dilutions différentes de la solution de titre x auxquelles a été comparée une solution d'atropine à 2 pour 100. Il est possible de déduire de ces expériences l'activité de la solution de titre inconnue en fonction de l'activité mydriatique de l'atropine.

Les résultats exposés ci-dessus montrent que la solution de titre $0{,}65\ x$ a sensiblement la même action que la solution étalon à 2 pour 100 ; on en déduit la valeur de $x = \dfrac{2}{0{,}65} = 3$ pour 100. La solution à examiner agit donc comme une solution contenant 3 grammes d'atropine dans 100 centimètres cubes d'eau.

L'erreur maximum que l'on peut commettre dans une telle série d'expériences est importante et peut atteindre 30 pour 100.

TABLEAU XI.

Essais comparatifs d'une solution d'atropine de titre x et d'une solution d'atropine à 2 pour 100.

	SURFACE PUPILLAIRE (millimètres carrés)	
Normal	4,4	4,4
Temps (minutes)	Sulfate d'atropine 2/100	Sulfate d'atropine *x*
5	5,1	5,4
10	5,4	6,1
15	5,4	6,1
20	6,1	6,1
25	6,8	6,8
30	6,8	6,8
35	7,8	8,6
40	8,8	8,6
50	8,6	8,6
60	8,6	9,4

Augmentation pupillaire maximum pour 100 provoquée en 60 minutes par l'étalon

$$\frac{42 \times 100}{44} = 95 \text{ pour } 100.$$

Augmentation pupillaire maximum pour 100 provoquée en 60 minutes par la solution à examiner

$$\frac{50 \times 100}{44} = 113 \text{ pour } 100.$$

La mydriase produite par la solution de titre *x* dépasse de 18 pour 100 celle qui est produite par l'atropine à 2 pour 100.

	SURFACE PUPILLAIRE (millimètres carrés)	
Normal	6,3	6,3
Temps (minutes)	Sulfate d'atropine 2/100	Sulfate d'atropine *x*
5	6,3	6,3
10	6,3	6,3
15	6,3	6,3
20	7	7
25	7	7,6
30	7,5	7,6
35	7,5	7,6
40	7,5	8,2
50	7,5	8,2
60	7,5	8,6

Augmentation pupillaire maximum pour 100 provoquée en 60 minutes par l'étalon

$$\frac{12 \times 100}{63} = 19 \text{ pour } 100.$$

Augmentation pupillaire maximum pour 100 provoquée en 60 minutes par la solution à examiner.

$$\frac{19 \times 100}{63} = 30 \text{ pour } 100.$$

La mydriase produite par la solution de titre *x* dépasse de 11 pour 100 celle qui est produite par l'atropine à 2 pour 100.

TABLEAU XII.

Dosage d'une solution d'atropine de titre inconnu.

	AUGMENTATION DE LA SURFACE PUPILLAIRE					MOYENNE DES DIFFÉRENCES DES AUGMENTATIONS POUR 100 des surfaces pupillaires observées dans les divers essais.
	essai 1	essai 2	essai 3	essai 4	essai 5	
Étalon (2 pour 100). .	95	19	8			
Solution de titre x.	113	30	24			$\frac{18+11+13}{3}=14.$
Étalon (2 pour 100). .	24	107	47			
Solution de titre 0,8 x.	39	120	47			$\frac{15+13}{2}=9.$
Étalon (2 pour 100). .	60	102	37	90	90	
Solution de titre 0,65 x.	60	102	39	90	90	$\frac{2}{5}=0,2.$
Étalon (2 pour 100). .	63	23				
Solution de titre 0,50 x.	54	23				$\frac{9}{2}=4,5.$
Étalon (2 pour 100). .	65	64	90	72	82	
Solution de titre 0,35 x.	21	17	48	47	44	$\frac{44+47+42+25+38}{5}=39.$

BIBLIOGRAPHIE

[1] Fr. POOS, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 126,* 1927, 307.
[2] MUNCH, *Journ. A. O. A. C. 10,* 1927, 383.
[3] Jeanne LÉVY et R. HAZARD, *Archiv. intern. de Pharm. et de Thérap. 36,* 1929, 26.

CHAPITRE III.

VASOCONSTRICTEURS ET VASODILATATEURS

Le pouvoir vasomoteur d'une substance peut être déterminé à l'aide de nombreuses techniques. Sans envisager les méthodes qui mesurent la vasoconstriction ou la vasodilatation rénale ou splénique, nous n'exposerons ci-dessous que les méthodes utilisant la perfusion des vaisseaux, méthodes de perfusion du train postérieur de grenouille (Laewen, Trendelenburg [1]), de l'oreille de lapin (Swetschnikow [2], Pissemski [3]), de la tête et du train postérieur de lapin, de chat, de chien (Heymans, Régniers [4]), ainsi que de cobaye.

Toutes ces méthodes permettent la comparaison de l'activité de deux substances vasomotrices, sans toutefois prétendre être la base d'un dosage biologique rigoureux. Nous décrirons ci-dessous les techniques qu'elles utilisent.

1° *Essai sur la grenouille.*

Cette méthode étudiée par Laewen, Trendelenburg, Fuehner [5] consiste à provoquer une circulation artificielle dans les membres postérieurs d'une grenouille et à évaluer l'action vasomotrice produite par une substance ainsi perfusée en mesurant le nombre de gouttes de liquide qui s'écoulent par minute, des vaisseaux de l'animal.

Technique. — Après avoir décapité la grenouille et lui avoir détruit la moelle, on la fixe sur une planchette de dissection. On incise horizontalement la peau entre les deux pattes supérieures, puis on incise verticalement la paroi de part et d'autre à 2 centimètres de la ligne médiane, de telle sorte qu'un lambeau rectangulaire puisse être facilement rabattu sur les membres postérieurs.

On récline la masse intestinale et les organes génitaux, puis on lie les deux veines cardinales très facilement distinctes. L'aorte abdominale est isolée avec précaution. On introduit dans l'aorte incisée, une petite canule métallique très fine portant un embout que l'on met en communication, au moyen d'un tube de caoutchouc, avec le flacon contenant une solution de Ringer. On isole la veine cave qui adhère à la paroi du lambeau rabattu et on introduit dans cette veine une fine canule de verre par laquelle doit sortir le liquide. Lorsque la perfusion est établie, le liquide de Ringer pénètre dans l'aorte, circule dans les pattes postérieures de la grenouille et s'écoule par la veine cave. Chaque goutte tombe sur un petit plateau de clinquant fixé sur le levier d'un tambour manipulateur qui communique au moyen d'un tube de caoutchouc avec un tambour inscripteur. Le style de ce dernier inscrit chaque goutte qui s'écoule sur un cylindre enregistreur. Le réservoir de Ringer est placé à environ un mètre au-dessus de la table de travail et un dispositif particulier permet d'obtenir une pression constante. Le produit dont on désire étudier l'action, peut être injecté par une aiguille fine dans le tube de caoutchouc relié à l'embout de la canule artérielle.

Nous avons apporté à la technique classique quelques modifications que nous signalons ci-dessous. Afin d'obtenir un débit plus rapide du liquide de Ringer nous avons placé ce liquide dans un réservoir d'où il s'écoule sous l'influence d'une pression d'air maintenue constante et mesurée à l'aide d'un manomètre à mercure.

La solution de Ringer utilisée dans les essais est préparée

extemporanément en ajoutant à 90 centimètres cubes d'eau distillée 95 centimètres cubes de la solution 1 et 5 centimètres cubes de la solution 2, dont la composition est donnée ci-dessous :

Solution 1.

Chlorure de sodium	65 g.
Chlorure de potassium	1 g. 4
Chlorure de calcium	1 g. 2
Phosphate de soude	0 g. 2
Eau distillée	950 cm³.

Solution 2.

Bicarbonate de soude	30 g.
Eau distillée	500 cm³.

Ayant mesuré le débit normal de la solution de Ringer, on perfuse le produit à examiner et on note le nombre de gouttes qui s'écoulent par minute. L'augmentation ou la diminution du débit de la solution de Ringer permet d'apprécier l'action vasomotrice de la substance étudiée.

2° *Essai sur l'oreille isolée de lapin.*

Cette méthode mise au point par Swetschnikow et Pissemski est basée sur le même principe que la précédente. Elle utilise la technique suivante : on peut opérer soit sur le lapin anesthésié, soit sur le lapin tué et saigné dont on isole une oreille qui est fixée sur une planchette. On enlève la peau sur une surface de 1.5 à 2 centimètres carrés délimitée par une incision circulaire. On fait pénétrer dans l'artère médiane une canule de verre remplie de Ringer, communiquant avec un réservoir de Ringer. Sous l'extrémité béante de chaque veine marginale on dispose une petite bandelette de papier filtre pour collecter le liquide de perfusion, qui sort des veines, arrive dans une petite cuvette per-

forée d'où les gouttes s'écoulent et tombent sur le levier d'un signal électrique enregistreur.

On mesure d'une part, le nombre de gouttes qui s'écoulent normalement à travers l'oreille du lapin et d'autre part, celles qui s'écoulent lorsque l'on perfuse la substance à examiner ; la comparaison des deux débits permet d'apprécier l'action vasomotrice de la substance examinée.

3° *Essai sur le lapin, le chat et le chien.*

Cette méthode qui est due à Heymans et Regniers consiste à perfuser soit la tête, soit les pattes postérieures de l'animal.

a) *Perfusion de la tête.* — L'animal est anesthésié et saigné à blanc. On dénude les jugulaires et les carotides et on ligature d'un même côté la carotide et la jugulaire antérieure. On incise la peau, on enlève le plastron sternal pour mettre le cœur à nu et on pose une forte ligature en bloc autour de tous les vaisseaux cardiaques. On place une canule dans le bout céphalique de la veine jugulaire du côté perfusé pour permettre l'écoulement du liquide, une autre canule dans le bout céphalique de la carotide.

La perfusion est aussitôt commencée. Le liquide de perfusion s'échauffe dans un tube en spirale placé dans un manchon où circule de l'eau chaude et arrive dans la carotide. La vasodilatation et la vasoconstriction causées par la perfusion d'une substance à action vasomotrice est mesurée, à la fois, par un manomètre à eau greffé latéralement sur le tube carotidien et par un compte-goutte électrique.

b) *Perfusion du train postérieur.* — L'animal est anesthésié et saigné à blanc. On ouvre sa cavité abdominale, on retire les intestins et on isole l'aorte abdominale et la veine cave qu'on libère et auxquels on adapte une canule. Pour empêcher toute fuite de liquide on place la chaîne d'un écraseur de Chassaignac autour du corps, au niveau de la région lombaire, pour compri-

mer tous les vaisseaux de la colonne vertébrale. Le liquide de perfusion traverse l'aorte abdominale, circule dans les pattes postérieures de l'animal puis s'écoule par la veine cave. La vasoconstriction et la vasodilatation sont mesurées, comme dans le cas précédent, par un manomètre à eau et par un compte-goutte électrique.

4° *Essai sur le cobaye.*

Nous avons appliqué au cobaye la méthode de Heymans et Regniers et nous avons perfusé soit la tête, soit les pattes postérieures de l'animal.

a) *Perfusion de la tête.* — L'animal est tué par saignée ; la technique suivie est en tous points comparable à celle qui a été utilisée pour le lapin, le chat et le chien. Le liquide de perfusion utilisé est préparé extemporanément en ajoutant à 900 centimètres cubes d'eau distillée, 1 gramme de glucose anhydre, 95 centimètres cubes de la solution 3 ainsi que 5 centimètres cubes de la solution 4, dont la composition est donnée ci-dessous :

Solution 3.

Chlorure de sodium.	180 g.
Chlorure de potassium.	4 g.
Bicarbonate de soude.	4 g.
Eau distillée.	900 cm³

Solution 4.

Chlorure de calcium fondu.	24 g.
Eau distillée.	500 cm³.

Le récipient contenant le liquide de perfusion est placé dans un thermostat dont la température est maintenue constante à 40° grâce à un régulateur de toluène. Le réservoir communique d'une part, par un tube de verre avec un dispositif fournissant

une pression d'air qui reste constante pendant la durée d'une expérience et d'autre part avec la canule placée dans la carotide du cobaye. Un manomètre à mercure et un thermomètre placés sur le trajet du liquide de perfusion permettent de contrôler à chaque instant la pression sous laquelle il s'écoule et sa température.

Lorsque la perfusion est établie, le liquide pénètre dans la carotide, circule dans la tête du cobaye et s'écoule par la veine jugulaire antérieure. Chaque goutte tombe sur un petit plateau de clinquant fixé sur le levier d'un tambour manipulateur relié à un tambour inscripteur. Le style de ce dernier inscrit chaque goutte perfusée sur un cylindre enregistreur. La vitesse avec laquelle tourne le cylindre enregistreur est donnée par l'inscription du temps en secondes au moyen d'un chronographe de Jacquet.

Le produit dont on veut examiner l'action est mis en solution dans le liquide de Locke. Cette solution est amenée à la même température que le liquide perfusé. On injecte dans le tube de caoutchouc relié à la canule placée dans la carotide, au moyen d'une seringue munie d'une fine aiguille, 1 ou 2 centimètres cubes de cette solution. Il est également possible, à l'aide d'un flacon placé dans le thermostat, de perfuser d'une façon continue dans les vaisseaux du cobaye une solution diluée d'une substance quelconque.

La vasoconstriction ou la vasodilatation causée par la perfusion d'une substance est mesurée par l'augmentation ou la diminution du nombre des gouttes perfusées par minute.

b) *Perfusion des pattes postérieures.* — La technique employée est absolument comparable à celle de Heymans et Regniers sur le lapin, le chat et le chien. Le dispositif que nous avons utilisé est identique à celui que nous avons décrit ci-dessus pour la perfusion de la tête de cobaye.

Dans un certain nombre d'expériences, nous avons perfusé sur le même animal, simultanément la tête et les pattes postérieures.

Les expériences en série que nous avons ainsi effectuées nous ont permis d'établir que les vaisseaux de la tête de cobaye étaient plus sensibles que ceux des pattes postérieures et qu'ils étaient plus aptes à permettre un essai biologique de l'activité de deux substances.

Nous avons, en effet, perfusé simultanément la tête et le train postérieur de cobaye et nous avons noté à chaque injection de 1 centimètre cube d'adrénaline à 1/200 000[1], pratiquée de 12 en 12 minutes, la vasoconstriction produite que nous avons rapportée à un débit normal de 100 gouttes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XIII.

Tableau XIII.

TEMPS (minutes).	NUMÉRO D'ORDRE DES INJECTIONS de 1 cm³ d'adrénaline à 1/200 000.	VASOCONSTRICTION POUR 100									
		1re EXPÉRIENCE		2e EXPÉRIENCE		3e EXPÉRIENCE		4e EXPÉRIENCE		5e EXPÉRIENCE	
		tête	pattes	tête	pattes	tête	pattes	tête	pattes	tête	pattes
0	1	48	20	1	30	21	26	38	15	46	13
12	2	57	50	19	35	51	50	55	31	66	32
24	3	68	64	41	37	90	61	76	71	71	38
36	4	81	75	74	21	86	89	85	92	84	51
48	5	83	68	77	51	87	90	84	90	81	57
60	6	85	70	84	76	90	88	95	92		

Nous pouvons conclure en nous basant sur les expériences réunies dans le tableau XIII qu'à partir de la 4e injection d'adrénaline à 1/200 000, la vasoconstriction des vaisseaux de la tête et même, dans une certaine mesure, celle des vaisseaux du train postérieur est constante si on injecte la même quantité de substance. Il est donc possible, quand la sensibilité des vaisseaux paraît être stabilisée, de perfuser dans les vaisseaux de

1. La solution d'adrénaline utilisée comme étalon est préparée comme il est indiqué dans le chapitre II.

la tête du cobaye la substance dont on veut comparer l'action à l'adrénaline.

Exemple. — Essai biologique du pouvoir vasoconstricteur du chlorhydrate d'adrénaline. Pour comparer l'action de l'adrénalone à celle de l'adrénaline on cherche la dilution minimum de cette substance qui a la même action que 1 centimètre cube d'adrénaline à 1/200 000. On pratique dans les vaisseaux de la tête isolée de cobaye 3 injections successives de 1 centimètre cube d'adrénaline à 1/200 000, suffisantes pour rendre la vasoconstriction constante. On perfuse alors une dilution faible et peu active d'adrénalone et on note la vaconstriction observée. On augmente peu à peu la concentration de la solution d'adrénalone jusqu'à ce que la vasoconstriction atteigne celle d'une injection de 1 centimètre cube d'adrénaline à 1/200 000.

Nous résumons dans le tableau XIV les résultats obtenus sur un certain nombre de cobayes. Comme dans le tableau précédent nous avons rapporté la vasoconstriction observée à un rythme normal de 100 gouttes.

Tableau XIV.

NUMÉRO D'ORDRE DES COBAYES expérimentés	VASOCONSTRICTION PROVOQUÉE par l'adrénaline à la dilution de 1/200 000	VASOCONSTRICTION PROVOQUÉE PAR L'ADRÉNALONE				
		1/1000	1/300	1/700	1/500	1/400
1	40	15	18	25		
2	50				28	
3	58				54	
4	67				65	
5	48					79

On peut conclure des résultats ci-dessus exposés que l'adrénalone à 1/500 possède une activité vasocontrictrice sensiblement égale à celle de l'adrénaline à 1/200 000 ; elle semble donc 400 fois moins active que l'adrénaline ; mais, d'autre

part, il nous faut signaler que la vasoconstriction due à l'adrénalone persiste pendant un temps 4 à 5 fois plus long.

La même technique peut être utilisée pour comparer l'activité vasoconstrictrice de certaines substances médicamenteuses à une substance type autre que l'adrénaline qui pourra servir d'étalon. Bien entendu, il conviendra préalablement de déterminer, comme nous l'avons fait pour l'adrénaline, le comportement de cette substance étalon.

BIBLIOGRAPHIE

[1] A. Laewen, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 51*, 1904, 416. — P. Trendelenburg, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. 63*, 1910, 165.
[2] Swetschnikow, *Archiv. ges. Phys. 157*, 1914, 471.
[3] Pissemski, *Pflügers Archiv. 156*, 1914, 426.
[4] C. Heymans et P. Regniers, *Comp. R. Soc. biol. 90*, 1924, 89. — P. Regniers, *Archiv. intern. de Pharm. et de Thérap. 31*, 1926, 303.
[5] Fuehner, *Nachweis u. Bestim. v. Giften*. Urban und Swarzenburg, 1923, 188.

CHAPITRE IV

ANESTHESIQUES LOCAUX

L'emploi si fréquent en clinique des anesthésiques locaux explique d'une part le grand nombre d'anesthésiques locaux préparés synthétiquement, et d'autre part les essais qui furent tentés pour préciser les méthodes permettant de déterminer l'activité de ces substances et de comparer entre elles leurs valeurs anesthésiques. Les méthodes les plus diverses furent d'ailleurs instituées, dans ce but ; les unes s'appuyant sur les propriétés générales des anesthésiques locaux : toxicité, action anesthésique générale, action sur les muscles, l'intestin, le cœur ; les autres reposant sur leur propriété spécifique, à savoir leur action sur les éléments nerveux périphériques, terminaisons nerveuses et troncs nerveux.

Parmi les nombreuses techniques utilisées [1] pour les essais biologiques des anesthésiques locaux, nous choisirons pour les décrire celles qui ont fait l'objet de nombreux articles et d'une thèse de médecine très documentée de M. Jean Regnier [1] et qui sont d'ailleurs celles que nous utilisons au Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris.

1. Les techniques résumées ci-contre se trouvent décrites en détail dans la thèse de M. J. Régnier [1].

Mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses.

L'étude de l'action d'un anesthésique sur les terminaisons nerveuses peut s'effectuer soit sur les muqueuses buccales et nasales, soit sur la cornée et consiste en la détermination de la dilution maximum qui provoque l'anesthésie. La dernière méthode que nous exposerons ci-dessous, et qui a donné à Jean Régnier des résultats dont la constance fut vérifiée maintes fois par cet auteur et par nous-même, utilise la cornée du lapin.

Mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses de la cornée. — Cette méthode consiste à déterminer le nombre d'excitations nécessaires pour provoquer le réflexe cornéen sur un œil de lapin anesthésié, le nombre d'excitations étant considéré comme proportionnel à la valeur de l'anesthésique. Cette méthode n'ayant de valeur que si elle est comparative, tous les essais sont effectués simultanément sur l'anesthésique à étudier et sur le chlorhydrate de cocaïne choisi comme étalon.

Choix de l'animal. – Le lapin est choisi comme animal d'expérience. On utilise dans chaque essai quatre lapins.

Mode opératoire. — Le réflexe normal étant vérifié à la minute 0 et à la minute 4, on place à la minute 4 1/2, sur la cornée du lapin maintenu immobile et dont l'œil est ouvert de façon que le globe oculaire regarde en haut, une goutte de la solution anesthésique à une concentration déterminée ; à la minute 5 1/2 on verse de nouveau une goutte de la solution sur la cornée du lapin ; à la minute 6 1/2 on laisse le lapin au repos ; à la minute 8 on recherche s'il y a eu anesthésie en effectuant au moyen d'un crin fin un certain nombre d'excitations régu-

lières sur la cornée avec un rythme suffisamment rapide (environ 100 excitations par minute). On note le nombre d'excitations nécessaires pour obtenir la fermeture complète de la paupière. Si la centième excitation est atteinte sans qu'il y ait fermeture de la paupière, on arrête les excitations et l'on note le chiffre 100. On procède de la même manière aux minutes 10, 12 1/2, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60. Les nombres des excitations obtenues pendant la première heure sont additionnés et leur total exprime la valeur de l'anesthésique.

Une détermination analogue est faite sur le second œil ; on répète le même essai sur quatre lapins, puis on fait la moyenne des chiffres obtenus dans chaque expérience. Si l'anesthésique n'est pas irritant, l'animal peut servir de nouveau dès le lendemain. Il y a d'ailleurs avantage, pour qu'il n'y ait pas d'accoutumance à faire rapidement les essais comparatifs de deux substances.

Pour évaluer la valeur d'un anesthésique on peut déterminer la concentration de la solution de cocaïne qui a la même action que l'anesthésique utilisé. Comme cette concordance est difficile à obtenir, on peut opérer comme suit : on effectue deux séries d'essais sur les mêmes lapins avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne étalon telles que l'on obtienne des chiffres encadrant celui qui représente la valeur de l'anesthésique à examiner. Par un simple calcul [2], on obtient la concentration de chlorhydrate de cocaïne qui correspond au chiffre fourni par la solution à étudier.

Soient T le titre pour 100 de la solution de cocaïne la plus concentrée.

t le titre pour 100 de la solution de cocaïne la plus diluée.

N le nombre d'excitations correspondant à T.

n le nombre d'excitations correspondant à *t*.

U le titre pour 100 de l'anesthésique étudié.

M le nombre d'excitations correspondant à U.

Y le titre pour 100 de la solution de chlorhydrate de cocaïne équivalent à U.

$$Y = T\frac{(M-n)\times t(N-M)}{N-n}.$$

La valeur relative de l'anesthésique étudié par rapport à la cocaïne $= \frac{Y}{U}$.

Exemple. — Détermination de la valeur anesthésique du chlorhydrate du dérivé benzoylé de la norhomoéphédrine[1].

$$C^6H^5 - CH(OCOC^6H^5) - CH(C^2H^5) - NH^2, HCl$$

Nous résumons dans le tableau XV les résultats obtenus dans cet essai biologique.

Tableau XV.

NUMÉRO D'ORDRE DES ESSAIS	NOMBRE D'EXCITATIONS obtenues avec la cocaïne à 1 %	NOMBRE D'EXCITATIONS OBTENUES avec la substance à examiner à la dilution de 1 %	NOMBRE D'EXCITATIONS obtenues avec la cocaïne à 0,5 %
1	528	413	260
2	479	422	217
3	429	421	160
4	432	427	123
5	615	464	200
6	618	462	220
7	616	432	242
8	611	424	245
Moyenne. . . .	541	433	208

$$\gamma = \frac{(433-208)\times 1 + (541-433)\times 0{,}5}{541-208} = \frac{225-54}{333} = 0{,}838.$$

Ainsi une solution de cocaïne à 0,84 pour 100 possède la même activité qu'une solution du dérivé benzoylé de la norhomoéphédrine à 1 pour 100.

1. Cette substance a été préparée par nous-même au laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine (section de chimie).

L'anesthésique étudié a une activité qui est égale à

$$\frac{0,84}{1} = 0,84 \text{ de celle de la cocaïne.}$$

Mesure de l'anesthésie produite sur les troncs nerveux.

De telles mesures ont été effectuées par divers auteurs, soit sur les nerfs moteurs (sciatique de grenouille, préparation neuro-musculaire du sartorius de grenouille, sciatique de lapin ou de chien), soit sur les nerfs sensitifs (nerf sciatique de grenouille, nerf lingual de chien). Nous décrirons la méthode utilisant le nerf lingual de chien.

Mesure de l'anesthésie produite par une substance sur un nerf lingual de chien. Technique de Régnier et Valette [3]. — Cette technique utilise l'action d'un anesthésique sur le lingual, voie sensitive du réflexe linguo-maxillaire étudié par H. Cardot et H. Laugier [4]. Elle consiste à suivre par la mesure de la chronaxie l'influence des anesthésiques locaux sur le nerf lingual. En effet, sous l'influence des anesthésiques locaux on observe un abaissement de la chronaxie du nerf lingual qui, dans certaines limites de temps et de dilution, varie en fonction de la dose de l'anesthésique utilisé. Il est donc possible par comparaison des baisses respectives de chronaxie d'un nerf sous l'influence de deux anesthésiques locaux d'évaluer leur activité relative. Dans tous les essais, le chlorhydrate de cocaïne a été utilisé comme étalon.

MM. Régnier et Valette [4] construisent une courbe (fig. 10) en portant en abscisses les doses de chlorhydrate de cocaïne utilisées et en ordonnées les valeurs représentant les baisses moyennes minima de chronaxie. Cette courbe étalon qui a été

établie d'après un certain nombre d'expériences permet d'exprimer la valeur d'un anesthésique par rapport à celle de la cocaïne.

Préparation de l'animal. — Le chien est anesthésié au moyen de chloralose (voir chapitre II) qui agit peu sur le seuil du réflexe utilisé. La chronaxie du nerf lingual (0,10) se stabilise

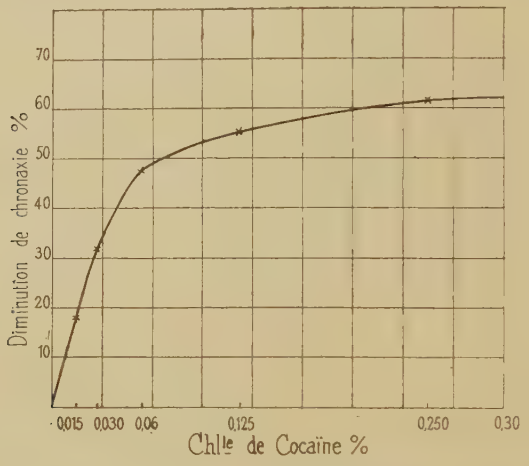

Fig. 10. — D'après Régnier et Valette. [5] Courbe établie en portant en abscisses les concentrations en chlorydrate de cocaïne et en ordonnés les diminutions pour 100 de chronaxie du nerf lingual.

généralement en quinze ou vingt minutes. L'animal est placé dans une gouttière de Claude Bernard, la tête dépassant la gouttière à laquelle est fixée la mâchoire supérieure. Un des nerfs linguaux est isolé et dénudé.

Instrumentation. — Les mesures d'excitabilité du nerf lingual sont faites à l'aide des décharges de condensateurs.

On utilise :

1° 10 accumulateurs de 2 volts.

2° Un réducteur de potentiel permettant de fractionner le voltage.

3° Une série de capacités étalonnées de 5 microfarads à 5/1 000 de microfarads.

4° Une clef de charge et de décharge.

5° Un shunt.

6° Un excitateur composé de deux électrodes d'argent chlo-

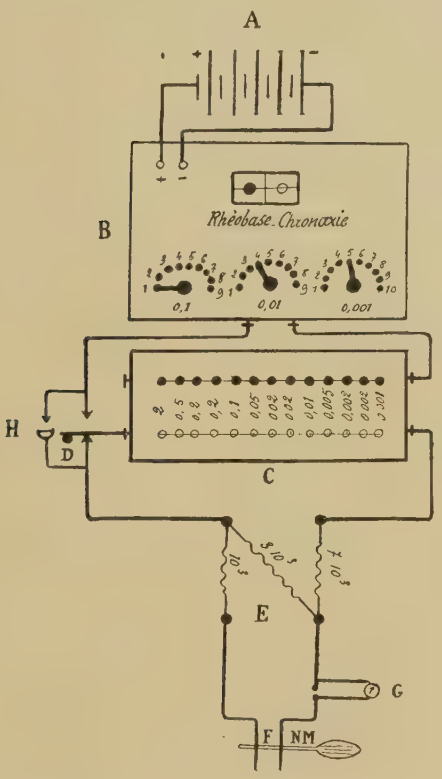

FIG. 11.

Schéma du montage pour l'excitation par les décharges de condensateurs.

A, source de potentiel ; B, réducteur de potentiel ; C, boîte de capacités étalonnées ; D, clé de charge et de décharge ; E, boîte de résistances formant shunt ; F, excitateur ; G, galvanomètre ; N, M, préparation nerf muscle ; H, interrupteur à mercure.

ruré légèrement recourbées sur lesquelles il est possible de placer le nerf lingual.

Ces appareils sont montés conformément à la figure 11.

Détermination de la chronaxie normale du nerf lingual. —

Le nerf lingual, après qu'il a été dénudé, est entouré de coton imbibé de liquide de Ringer [1], puis placé sur des électrodes d'argent chloruré de telle sorte que la cathode se trouve à la naissance de l'excitation des centres réflexes. On peut alors procéder à la détermination de la chronaxie.

1° On détermine la rhéobase, c'est-à-dire le voltage minimum qui détermine le plus petit mouvement du maxillaire inférieur.

2° On double ce voltage (certains appareils permettent de doubler automatiquement la valeur du voltage rhéobasique). On détermine avec ce voltage double en allant des petites capacités aux grandes la capacité (C) qui fournit le seuil de l'excitation.

3° Après avoir déterminé la capacité, on vérifie la stabilité de la rhéobase.

4° On déduit de ces mesures la chronaxie qui est égale à

$$C \times 0{,}36 \times 10^4.$$

Détermination de la baisse de chronaxie du nerf lingual sous l'influence d'un anesthésique. — Après avoir déterminé la valeur de la chronaxie du nerf lingual et s'être assuré par des mesures répétées à deux ou trois reprises à 10 minutes d'intervalle, de la constance de la chronaxie, on substitue au coton imbibé de liquide de Ringer, un coton trempé dans la solution de l'anesthésique à étudier et on détermine de 10 en 10 minutes la baisse minimum de chronaxie.

Exemple. — Mesure de l'anesthésie provoquée sur le nerf lingual de chien par le chlorhydrate du dérivé benzoylé de la norhomoéphédrine.

On détermine la baisse minimum de chronaxie provoquée par

1. La solution de Ringer employée a la composition suivante :

NaCl.	9 g.
KCl.	0g,42.
$CaCl^2$.	0g,24.
CO^3NaH.	3 g.
PO^4NaH^2.	0g,014.
H^2O Q. S. pour.	1 000 cm³.

une certaine dilution de l'anesthésique étudié. Comme il est indiqué ci-dessus, pour qu'un tel essai soit correct il faut employer une concentration telle que la baisse minimum de chronaxie soit comprise entre 30 et 40 pour 100 (voir tableau XVI). L'expérience peut être effectuée sur les deux nerfs linguaux du chien. En général, trois essais suffisent pour déterminer l'activité d'une substance (Tableau XVII).

Tableau XVI.

HEURE	CHIEN = 10kg,800.		
	RHÉOBASE	CAPACITÉ	RHÉOBASE
3h,20	080	0,037	080
3h,30	130	0,039	130
3h,40	140	0,038	140
Action du dérivé benzoylé de la norhomoéphédrine à 1/2500.			
3h,50	140	0,037	140
4h	160	0,034	160
4h,10	160	0,035	160
4h,20	190	0,029	190
4h,30	270	0,024	270
4h,40	270	0,029	270
4h,50	280	0,029	280

Baisse de la capacité : 0,014.

Baisse pour 100 de la capacité $= \frac{0{,}014 \times 100}{0{,}038} = 36.$

Baisse pour 100 de la chronaxie : 36.

Tableau XVII.

TITRE des solutions de norhomoéphédrine benzoylé.	P. H. des solutions	CAPACITÉ normale	BAISSE de la capacité	BAISSE pour 100 de la chronaxie.
1/2500	6,8	0,038	0,014	36
1/2500	6,8	0,031	0,009	29
1/2500	6,8	0,031	0,011	35

Baisse moyenne pour 100 de la chronaxie = 33.

Pour évaluer l'activité de la substance examinée par rapport à la cocaïne sur le nerf lingual de chien, on mène sur la courbe étalon (voir fig. 10) une parallèle à l'axe des abscisses en portant en ordonnée la valeur 33. Cette droite coupe la courbe en un point qui a pour abscisse 0,033 pour 100. Ainsi le corps étudié agit à la dilution de 1/2 500 comme une solution de cocaïne à 1/3 000.

On peut en conclure que l'anesthésie du nerf lingual de chien produite par le dérivé benzoylé de la norhomoéphédrine a une valeur qui représente 80 pour 100 de celle qui est produite par la cocaïne.

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. Régnier, *Thèse de doctorat en Médecine*. Paris, 1929, Builliard, Saint-Dizier.
[2] G. Valette, *Thèse de doctorat en Pharmacie*. Paris, 1926, Davy.
[3] J. Régnier et G. Valette, *Bul. Scienc. Pharm. 36,* 1929, 284.
[4] H. Cardot et H. Laugier, *Archiv. int. Phys. 21,* 1923, 295.

CHAPITRE V

DOSAGE DE LA NARCOTINE DANS CERTAINES PRÉPARATIONS A BASE DE POUDRE D'OPIUM

Des recherches récentes [1] ont permis d'établir un dosage biologique de la narcotine dans des solutions contenant à la fois de la morphine et de la narcotine, ainsi que dans certaines préparations à base de poudre d'opium. Nous donnerons ici le principe de cette méthode de dosage ainsi que son mode opératoire.

Dosage biologique de la narcotine dans les préparations à base de poudre d'opium.

Cette méthode utilise l'action inhibitrice des alcaloïdes de l'opium sur l'intestin isolé de cobaye, action qui, dans tous les cas, s'additionne sans jamais présenter de phénomènes de renforcement ou de potentialisation.

La narcotine peut être dosée [1] dans les solutions aqueuses de ses sels, dans un mélange des divers alcaloïdes de l'opium ou dans quelques préparations injectables introduites recemment en thé-

1. Le dosage de la narcotine dans l'extrait d'opium est impossible par cette méthode, car l'extrait d'opium contient de l'acide méconique, de la méconine et des résines, substances qui sont toutes actives sur l'intestin isolé de cobaye.

rapeutique, en comparant son action sur l'intestin isolé de cobaye à l'action d'une solution titrée de narcotine.

Le dosage de la narcotine est possible, soit en utilisant directement des solutions suffisamment diluées pour éliminer l'action de la morphine et celle des autres alcaloïdes qui se trouvent, dans ces conditions, à des dilutions inférieures à celles de leur seuil d'action respectif, soit en ajoutant aux solutions à examiner, une certaine quantité connue de narcotine, ce qui permet de diluer suffisamment ce mélange pour que la narcotine soit titrée seule.

Préparation de l'animal. — On emploie un cobaye ayant mangé trois ou quatre heures avant l'expérience. Sur le cobaye décapité, on prélève immédiatement quelques morceaux d'intestin de 1 à 1^{cm},5 que l'on ligature in situ, au moyen d'une soie fine, de telle sorte qu'ils conservent intégralement leur contenu. Les morceaux d'intestin détachés sont immergés dans du liquide de Tyrode[1] maintenu dans un thermostat à 39°,5 et oxygéné par un courant d'air qui le traverse bulle à bulle.

Appareil. — L'appareil employé est identique à celui qui est utilisé pour les dosages d'hypophyse et d'ergot et qui a été décrit dans le chapitre III de la deuxième partie de ce travail.

Mode opératoire. — Après avoir préparé les fragments d'intestin isolé de cobaye comme il est dit ci-dessus et avoir attendu le temps suffisant pour que le péristaltisme reprenne son régime normal, on fait agir une solution titrée de narcotine pure provoquant une baisse de tonus suffisante, sans amener une excitation notable du péristaltisme : on répète après lavage de l'intestin et reprise normale du péristaltisme la même dose jusqu'à ce que la baisse du tonus soit constante deux fois de suite. On fait alors agir une dose de la préparation à examiner telle qu'elle produise une baisse de tonus de même ordre de grandeur. On cherche enfin à obtenir successivement deux baisses de tonus identiques

1. La composition du liquide de tyrode utilisé est donnée dans la deuxième partie de ce travail, chap. III.

l'une avec la préparation à doser, l'autre avec la solution titrée de narcotine et l'on en déduit, si l'on a opéré en solution suffisamment diluée, la quantité de narcotine contenue dans la préparation.

On peut également déduire la teneur en narcotine d'une préparation en comparant des baisses de tonus un peu différentes entre elles et en appliquant les lois des proportions, mais

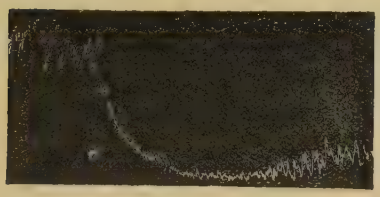

Fig. 12. — Action sur l'intestin isolé de cobaye d'un mélange narcotine-morphine à parties égales à la dose de 1/50 000 (Dans ce mélange la narcotine agit donc à la dose de 1/100 000).

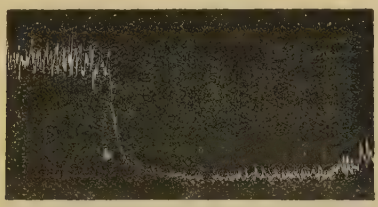

Fig. 13. — Action de la narcotine à 1/100 000 sur le même fragment d'intestin isolé de cobaye.

les résultats obtenus sont meilleurs en cherchant à comparer directement sur les tracés des courbes identiques.

Exemples : 1° *Dosage de la narcotine dans une solution à parties égales narcotine-morphine.* — La solution du mélange narcotine-morphine dans lequel on se propose de doser la narcotine est diluée à 1/50 000 ; 1 centimètre cube de cette solution produit une baisse importante du tonus de l'intestin isolé de cobaye (Voir fig. 12). Il faut utiliser une solution de chlorhydrate de narcotine à 1/100 000 pour qu'un centimètre cube produise une baisse du tonus de même importance sur le même fragment d'intestin (Voir fig. 13). On peut en déduire que la solution à 1/50 000 contient par centimètre cube, $0^{mg},01$ de chlorhydrate de narcotine et que la solution mère en contient $0^{g},5$ par centimètre cube.

2° *Dosage de la narcotine dans une solution contenant morphine, narcotine, codéine, papavérine dans les proportions de*

la poudre d'opium. — 1 centimètre cube du mélange est ajouté à 300 centimètres cubes d'eau. On fait agir sur l'intestin isolé de cobaye 1 centimètre cube de cette dilution qui produit une baisse du tonus intestinal (voir fig. 14). Pour obtenir une baisse de tonus de même importance sur le même fragment d'intestin (voir fig. 15) il faut utiliser un centimètre cube d'une solution titrée de narcotine à 1/75 000. Ainsi 1 centimètre cube de la solution à examiner contient $0^{mg}.013$ de chlorhydrate de nar-

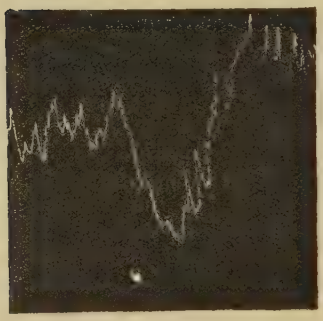

Fig. 14. — Action sur l'intestin isolé de cobaye d'un mélange de composition arbitrairement fixée (morphine : 10 grammes, narcotine : 4 grammes, codéine : $0^{g},5$, papavérine : $0^{g},5$) dans lequel la narcotine se trouve agir à la dose de 1/75 000.

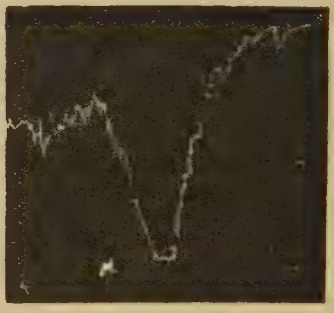

Fig. 15. — Action de la narcotine à 1/75 000 sur le même fragment d'intestin isolé de cobaye.

cotine et 1 centimètre cube de la solution mère en contient environ $3^{mg},9$.

3° *Dosage de la narcotine dans des extraits totaux injectables d'opium.* — Dans ce cas, il est nécessaire d'ajouter préalablement à l'extrait total, un volume égal d'une solution titrée de narcotine à 1/200. On peut alors pratiquer le dosage comme il est dit ci-dessus, car en diluant ce mélange à environ 1/500 000, on obtient des solutions dans lesquelles la papavérine et la codéine sont à des concentrations inférieures à leur seuil d'action respectif.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Jeanne Lévy et Olivier Gaudin, *Paris Médical 19*, 1929, 583. — Olivier Gaudin, *Thèse d'Université de Pharmacie*, 1930, Sagne et Cardinaux.

CONCLUSIONS

1° Les méthodes biologiques de contrôle des substances médicamenteuses tendent, dans un certain nombre de cas, à se substituer aux méthodes chimiques.

Elles sont applicables non seulement à des substances chimiquement définies, stables ou instables, mais encore à des drogues complexes végétales ou animales de composition inconnue et variable.

Ces méthodes, dont quelques-unes ont été préconisées par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations, sont peu à peu adoptées par les diverses pharmacopées.

2° Nous avons distingué dans ce travail le *dosage biologique* qui mesure l'activité d'une substance comparativement à un étalon et l'*essai biologique* qui permet de classer par ordre d'activité croissante des substances à action pharmacodynamique semblable.

3° Les substances dont le dosage biologique a été envisagé par le Comité d'Hygiène de la Société des Nations et dont nous avons étudié la technique dans la deuxième partie de ce travail sont les drogues digitaliques (digitale, strophantus, scille), l'adrénaline et les extraits surrénaux, les préparations d'hypophyse, l'ergot, les arsénobenzènes, l'insuline, les préparations de thyroïde, les drogues anthelminthiques.

Nous pouvons ajouter à ce groupe les préparations à base

d'opium dans lesquelles la narcotine peut, comme nous l'avons montré, être l'objet d'un dosage biologique.

4° Pour ce qui concerne les antithermiques, les myotiques et les mydriatiques, les vasoconstricteurs et les vasodilatateurs, les anesthésiques locaux, nous avons estimé qu'il n'est pas possible d'effectuer un dosage biologique rigoureux, mais nous avons indiqué les techniques qui permettent de comparer entre eux ces divers médicaments et de les classer d'après leur activité pharmacodynamique.

Vu :
Le Doyen
G. H. ROGER

Vu :
Le Président de Thèse
M. TIFFENEAU

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLETY.

CHARTRES. — IMPRIMERIE DURAND, RUE FULBERT (3-1930).